Mechanistische Studien der humanen DNA-Polymerase β mittels chemischer Sonden und gerichteter Evolution

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Sektion

der

Universität Konstanz

Vorgelegt von

Dipl.-Pharm.Chem. Francesca Di Pasquale

aus Bolzano, Italien

September 2008

Konstanzer Online-Publikations-System (KOPS)
URN: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-72908
URL: http://kops.ub.uni-konstanz.de/volltexte/2009/7290/

Dissertation der Universität Konstanz

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Jörg Hartig

1. Referent: Prof. Dr. Andreas Marx

2. Referent: Prof. Dr. Martin Scheffner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 2008

„Chi lo avrebbe mai detto!“

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Publikationen	Di Pasquale, F., Fischer, D., Grohmann, D., Restle, T., Geyer, A., and Marx, A., *Opposed Steric Constraints in Human DNA Polymerase beta and E. coli DNA Polymerase I.* J Am Chem Soc, 2008. 130(32): p. 10748-57.
Weitere Publikationen, die während der Promotion entstanden sind	Wanninger-Weiss, C., Di Pasquale, F., Ehrenschwender, T., Marx, A., and Wagenknecht, H.A., *Nucleotide insertion and bypass synthesis of pyrene- and BODIPY-modified oligonucleotides by DNA polymerases.* Chem Commun (Camb), 2008(12): p. 1443-5. Liebmann, M., Di Pasquale, F., and Marx, A., *A new photoactive building block for investigation of DNA backbone interactions: photoaffinity labeling of human DNA polymerase beta.* Chembiochem, 2006. 7(12): p. 1965-9.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 DNA, DNA-Polymerasen und deren Familien 1

1.1.1 Struktur und biologische Rolle der DNA 1

1.1.2 Biologische Rolle der DNA-Polymerasen und deren Familien 2

1.2 Reaktionsmechanismus der DNA-Polymerasen 4

1.3 DNA-Schäden und DNA-Reparatursysteme in Säugetieren 6

1.3.1 Die Polβ und die Basenexzisionsreparatur (BER) 8

1.4 Bypass von DNA-Schäden bei DNA-Polymerasen 11

1.5 Selektivität und Genauigkeit von DNA-Polymerasen 13

1.6 Gerichtete Evolution von DNA-Polymerasen 15

1.7 Ziel der Arbeit 21

2 Ergebnisse und Diskussion 23

2.1 Untersuchung der entgegengesetzten sterischen Einschränkung des aktiven Zentrums der Polβ und des Klenow Fragments der E. coli DNA-Polymerase I mithilfe von sterischen Sonden 23

2.1.1 Einleitung 23

2.1.2 Prozessierung von sterischen Sonden durch die Polβ und das KF(exo-) 24

2.1.3 Pre-steady-state Kinetiken für die Polβ 26

2.1.4 Pre-steady-state Kinetiken für das KF(exo-) 29

2.1.5 Diskussion 32

2.2 Funktionales Screening der Polβ 37

2.2.1 Einleitung 37

2.2.2 Erster Ansatz 38

2.2.2.1 Expression aktiver humaner Polβ 38

2.2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese zur Erstellung einer inaktiven Variante der Polβ39

2.2.2.3 Entwicklung eines auf Fluoreszenz basierenden Tests für das Screening 40

2.2.2.3.1 Aktivität der Polβ aus Lysat 40

2.2.2.3.2 Expressionstests im Multilochplattenformat 42

2.2.2.3.3 Native Lyse 44

2.2.2.3.4 Aktivität der Polβ aus Lysaten (96-Deepwellplatten) 44

2.2.2.3.5 Ni-NTA Affinitätschromatographie im 96-Well-Format 45

2.2.2.3.6 Optimierung eines Fluoreszenz-basierten Screeningsystems 47

2.2.2.4 Konstruktion einer Mutantenbibliothek des Polβ-ORFs 49

2.2.2.4.1 Mutazyme-Bibliothek 49

2.2.2.4.2 Fehleranfällige PCR 51

2.2.2.4.3 Übersicht des Screeningsystems 53

2.2.2.4.4 Evaluierung des Screeningsystems 54

2.2.2.5 Identifizierung der Polβ-Mutanten mit erhöhter Bypass-Aktivität einer abasischen Stelle durch funktionales Screening 56

2.2.2.6 Reinigung und Charakterisierung der Mutante 2N7 58

2.2.3 Entwicklung eines neuen Screeningsystems mithilfe eines Kodon-optimierten Gens der Polβ 60

2.2.3.1 Expression und Lyse mit dem Kodon-optimierten Gen 61

2.2.3.2 Konstruktion der Bibliothek Pool3 63

2.2.3.3 Übersicht des Systems 64

2.2.3.4 Evaluierung des Screenings mit Lysaten 66

2.2.3.5 Durchmusterung der Mutantenbibliothek 68

2.2.3.6 Radiometrische Untersuchung der ermittelten Mutanten 72

2.2.3.7 Diskussion der Ergebnisse aus den Durchmusterungen der Polβ-Mutantenbibliotheken 73

2.2.4 Charakterisierung der Polβ-Mutante 5P20 78

2.2.4.1 Einleitung 78

2.2.4.2 Sequenzierung der Mutante 5P20 78

2.2.4.3 Expression und Reinigung der Polβ WT und der Variante 5P20 81

2.2.4.4 Untersuchung der Bypass-Eigenschaften der Variante 5P20 über verschiedene DNA-Schäden ... 81
2.2.4.5 Untersuchung der spezifischen Aktivität und Prozessivität ... 86
2.2.4.6 Bindungsaffinität zur DNA ... 88
2.2.4.7 Kinetische Untersuchungen ... 90
2.2.4.7.1 Untersuchung auf unbeschädigtem Templat ... 90
2.2.4.7.2 Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle ... 92
2.2.4.7.3 Verlängerung nach einer stabilen abasischen Stelle ... 93
2.2.4.8 Analyse der Einzelmutationen ... 94
2.2.4.9 Diskussion der Ergebnisse aus der Charakterisierung der Mutante 5P20 .. 96
2.3 Zusammenfassung und Ausblick ... 109
3 Methoden ... 115
3.1 Synthese Oligodesoxynukleotide ... 115
3.2 Molekularbiologische Methoden ... 115
3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese ... 115
3.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese ... 116
3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen ... 118
3.2.4 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen ... 118
3.2.5 Ethanolpräzipitation ... 118
3.2.6 Quantitative Nukleinsäure-Bestimmung ... 119
3.2.7 Entfernung von Proteinverunreinigungen ... 120
3.3 Enzymatische Reaktionen ... 120
3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese ... 120
3.3.2 Ungerichtete Mutagenese ... 121
3.3.2.1 Mutazyme PCR ... 122
3.3.2.2 Fehleranfällige PCR (error prone-PCR) ... 123
3.3.3 Kolonie-Polymerase-Ketten-Reaktion (Kolonie-PCR) ... 125
3.3.4 5'-Phosphorylierung mit ^{32}P ... 126
3.3.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA ... 127

3.3.6 Dephosphorylierung ... 128
3.3.7 Ligation doppelsträngiger DNA ... 129
3.3.8 DNA-Sequenzierung ... 130
3.4 Bakterienkulturen ... 130
3.4.1 Plattenkultur ... 130
3.4.2 Flüssigkultur ... 130
3.4.3 Glycerinkultur ... 130
3.4.4 Plasmidisolierung ... 131
3.4.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* ... 131
3.4.6 Transformation von *E. coli* ... 132
3.5 Expression und Reinigung von Polβ ... 132
3.5.1 Expression ... 132
3.5.2 Native Lyse von Expressionskulturen ... 133
3.5.3 Proteinreinigung ... 134
3.5.4 Glycin SDS-PAGE Gelelektrophorese ... 135
3.5.5 Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen ... 136
3.5.6 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen ... 137
3.5.7 Proteinquantifizierung mit dem Bradford-Test ... 138
3.6 Aktivitätsuntersuchungen von DNA-Polymerasen ... 139
3.6.1 Primer-Verlängerungsreaktionen mit radiometrischer Produktanalyse ... 139
3.6.2 Screening einer Mutantenbibliothek von Polβ ... 140
3.6.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Polβ ... 142
3.6.4 Untersuchung der Prozessivität der Polβ ... 143
3.6.5 Untersuchung der Affinität der DNA-Polymerase zum Primer/Templat-Komplex mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese ... 143
3.6.6 Pre-steady-state kinetische Untersuchung ... 145
4 Materialien ... 147
4.1 Chemikalien ... 147
4.2 Nukleotide und Radiochemikalien ... 149
4.3 Standards und Kits ... 149

4.4 Enzyme und Proteine ... 149
4.5 Plasmide und Bakterienstämme ... 150
4.6 Medien und Puffer ... 150
4.7 Oligonukleotide ... 153
4.8 Verbrauchsmaterial ... 153
4.9 Geräte ... 154
5 Anhang ... 157
5.1 Oligonukleotidsequenzen ... 157
5.2 Vektorkarten ... 160
5.3 Nukleotidsequenzen der klonierten Polβ ... 161
5.3.1 Polβ-WT ORF in pET21b ... 161
5.3.2 Polβ-2N7 ORF in pET21b ... 162
5.3.3 Polβ-WT ORF in pGDR11 ... 163
5.3.4 Polβ-5P20 ORF in pGDR11 ... 164
5.4 Proteinsequenzen ... 165
5.4.1 Sequenz der Polβ in Plasmid pET21b ... 165
5.4.2 Sequenz der Polβ in Plasmid pGDR11 ... 166
5.5 Aminosäurealignment der verschiedenen Varianten mit der Wildtyp-Sequenz ... 167
5.5.1 Mutante 2N7 ... 167
5.5.2 Mutante 5P20 ... 167
5.6 Nomenklatur der natürlichen Aminosäuren ... 168
5.7 Abkürzungsverzeichnis ... 168
6 Literatur ... 173
7 Danksagung ... 187
8 Eidesstattliche Erklärung ... 188

1 Einleitung

1.1 DNA, DNA-Polymerasen und deren Familien

1.1.1 Struktur und biologische Rolle der DNA

Die Erbinformationen aller Organismen sind in Form von Genen festgehalten. Diese Gene sind aus Desoxyribonukleinsäure (DNA oder DNS) aufgebaut. Die Weitergabe dieses Erbguts von einer Generation zur nächsten ist die Lebensbasis aller Organismen.
Die DNA ist ein Polymer, das aus zwei antiparallelen Einzelsträngen besteht und die Form einer Doppelhelix annimmt (Abbildung 1A). Die Einzelstränge sind aus nacheinander folgenden Bausteinen aufgebaut, den Nukleotiden, die durch eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft sind. Die Nukleotide sind aus drei funktionalen Einheiten aufgebaut: einer Phosphorsäure, einer Desoxyribose-Einheit, und eine heterozyklische Nukleobase (Purin- oder Pyrimidin-Derivate; siehe Abbildung 1B und C).

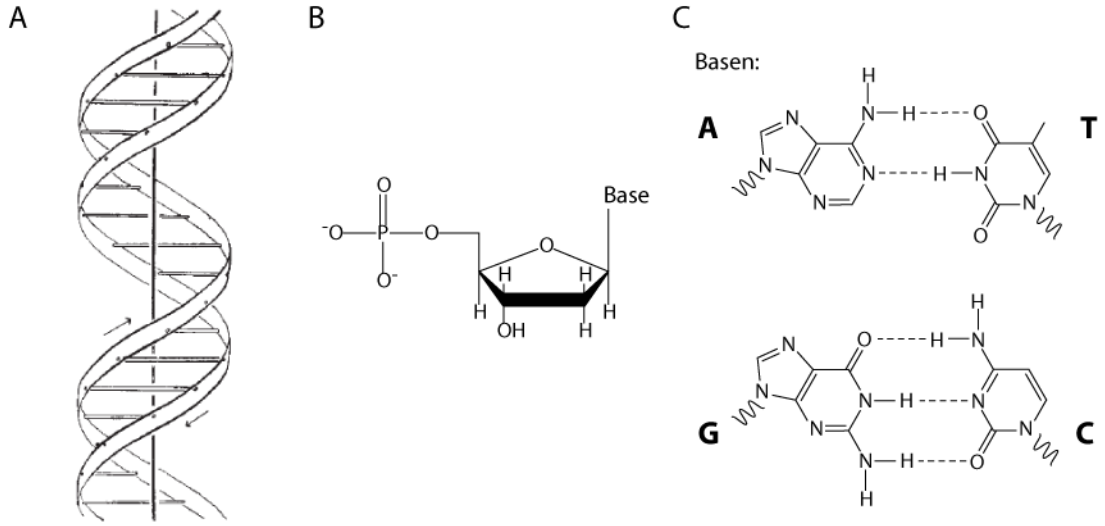


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA. (A) Struktur der Doppelhelix. Entnommen aus [1]. (B) Struktur eines Nukleotides. (C) Struktur der Nukleobasen in kanonischer Paarung.

Die Desoxyribose-Phosphate bilden das Rückgrat des Moleküls. Die Nukleobasen befinden sich im Inneren der Helix und verbinden über so genannte kanonische Paarungen die Einzelstränge durch Wasserstoffbrücken.
In natürlicher DNA existieren vier mögliche Nukleobasen: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) oder Cytosin (C). Dabei paart nach den Regeln von Watson und Crick Adenin immer mit Thymin und Guanin mit Cytosin [1](Abbildung 1).
Die Folge der Nukleobasen, die DNA-Sequenz, bestimmt die genetische Information. Die DNA-Sequenz ist somit der Bauplan für die Entstehung von Proteinen, den Werkzeugen aller Organismen. Dabei wird die DNA von RNA-Polymerasen abgelesen und in RNA umgeschrieben (Transkription), ein mRNA-Molekül entsteht, das dann für die Proteinsynthese an den Ribosomen als Templat verwendet wird (Translation).
Die genetische Information muss nicht nur als Matrix für die Protein-Synthese in der Zelle dienen, sondern sie muss außerdem von einer Generation zur nächsten intakt weitergegeben werden. Schon 1953 fiel *Watson* und *Crick* auf, „dass die speziellen Paarungen, die wir als gegeben voraussetzen, unmittelbar auf einen möglichen Vervielfältigungsmechanismus für die genetische Erbsubstanz schließen lassen“ [1]. Diese Beobachtung war tatsächlich treffend, denn dieser Erkennungsprozess liegt an der Basis der Replikation, die Vervielfältigung der DNA.

1.1.2 Biologische Rolle der DNA-Polymerasen und deren Familien

Die DNA ist keinesfalls ein statisches Molekül. Ständig wird die abgespeicherte Information abgelesen, kopiert und weitergegeben. Dafür ist ein Set von verschiedenen Enzymen notwendig, unter denen DNA-Polymerasen die Schlüsselrolle einnehmen. *Kornberg et al.* konnten 1956 zum ersten Mal eine DNA-Polymerase aus *Escherichia Coli* (*E. coli*) als solche charakterisieren [2]. Mindestens 15 verschiedene eukaryontische DNA-Polymerasen sind zurzeit bekannt [3].
Die Hauptfunktion der DNA-Polymerasen ist die Replikation der genomischen DNA [4]. Die eukaryontischen DNA-Polymerasen, die dafür verantwortlich sind, sind die

DNA-Polymerasen α, δ, ε und γ [3]. Der Mechanismus der Replikation erfolgt semi-konservativ, wobei der ursprüngliche DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge getrennt wird, an denen dann jeweils komplementäre Stränge neu gebildet werden [5, 6].

Bei diesen Prozessen entstehen immer wieder Fehler, die korrigiert werden müssen [7]. Für diese Funktionen sind andere DNA-Polymerasen zuständig, wie z.B. die DNA-Polymerase β und λ (Polβ und Pol λ) (für Details siehe 1.3)[8, 9]. Weitere DNA-Polymerasen sind für das Überlesen von DNA-Schäden zuständig (z.B. DNA-Polymerasen η, κ, ι und ξ; für Details siehe 1.4) [10, 11].

Außerdem gibt es eine DNA-Polymerase, die Telomerase, die für die Verlängerung der 3´-Enden von Chromosomen (Telomere) durch einfache, repetitive Sequenzen verantwortlich ist. Dies vermeidet die Verkürzung der Chromosomen, die bei jeder Replikation stattfindet, die zur Apoptose führen würde. Die Telomerase arbeitet bei dieser Funktion mit einer internen Templatsequenz [12].

Alle bisher bekannten DNA-Polymerasen teilen einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus und eine sehr ähnliche Struktur, die an eine rechte Hand erinnert [13, 14]. Allerdings unterscheiden sich die Eigenschaften verschiedener Polymerasen sehr [3]. Polymerasen, die in der Replikation der DNA involviert sind, besitzen eine hohe Genauigkeit und Prozessivität (ca. ein Fehler in 1 000 000 synthetisierten Phosphorsäurediester-Bindungen). Im Gegenteil dazu weisen Polymerasen, die z.B. in der Reparatur von DNA-Schäden oder in der somatische Hypermutation von Genen involviert sind, die für Immunoglobuline kodieren, eine viel niedrigere Genauigkeit und Schnelligkeit auf (ca. ein Fehler in 10 – 1 000 synthetisierten Phosphorsäurediester-Bindungen) [10, 15, 16].

Basierend auf Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeiten können DNA-Polymerasen in sieben Familien unterteilt werden (A, B, C, D, X, Y und RT) [17]. Die Familien A, B und C sind nach den Genen *polA*, *polB* und *polC* in *E. coli* benannt, die jeweils für die DNA-Polymerasen I, II und die α-Untereinheit der III kodieren [5]. Zu dieser Familien gehören die replikativen Polymerasen und einige Reparatur-Polymerasen, wie die DNA-

Polymerasen T7, *E. coli* PolI, und die eukaryontischen Polα, δ und ε. Die Familie D ist noch nicht genau charakterisiert und erfasst replikative DNA-Polymerasen aus Euryarchaeota. Zur Familie X gehören DNA-Polymerasen, die vorwiegend in der DNA-Reparatur involviert sind [9, 18]. Mitglieder davon sind die DNA-Polymerasen β, λ, μ und die Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT).
Die Familie umfasst DNA-Polymerasen, die homolog zur DNA-Polymerase IV und V von *E. coli* sind [10, 11]. Diese Enzyme sind für die Replikation beschädigter DNA zuständig. Bekannte Mitglieder sind *Dpo4*, die DNA-Polymerasen κ, η, ι und Rev1.

1.2 Reaktionsmechanismus der DNA-Polymerasen

Der Reaktionsmechanismus, mit dem ein Nukleotid eingebaut wird, ist bei allen DNA-Polymerasen sehr ähnlich. Das Enzym (E) bindet zuerst den Primer/Templat-Komplex (D_n) (Abbildung 2). Das dNTP (N) wird gebunden, und dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms („induced fit", Schließen der Fingerdomäne, E`) induziert, die zur Ausbildung einer Bindungstasche dient. Die korrekte Positionierung des eingetretenen dNTPs ist für die folgende Phosphoryltransferreaktion notwendig ($E'\cdot D_{n+1}P$).

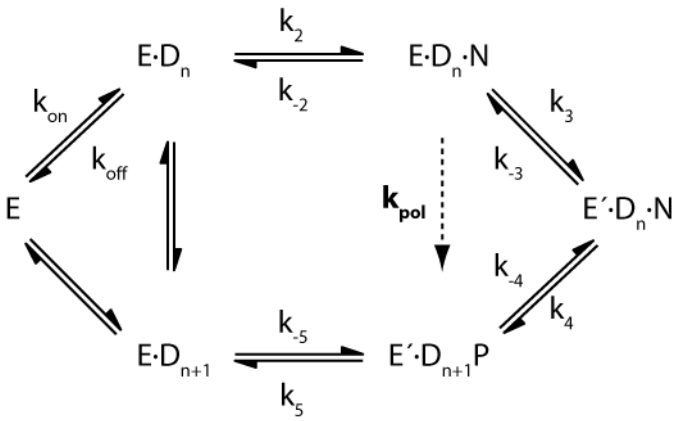


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kinetik einer Polymerisierungsreaktion.

Darauf folgt eine erneute Konformationsänderung, die das System wieder in die offene Konformation überführt und das Pyrophosphat (P) wird freigesetzt. An diesem Punkt kann die DNA-Polymerase entweder dissoziieren oder zum nächsten Einbau translokieren. Die Translokation erfolgt sehr schnell [19].

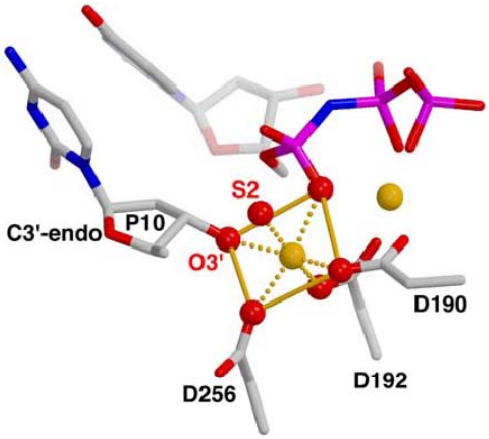


Abbildung 3: Postulierte Struktur des Übergangszustandes der nukleophilen Substitution von Pyrophophat durch die 3´-Hydroxylgruppe des Primerterminus. Die Mg^{2+} Ionen sind in Orange abgebildet. Ein Wassermolekül (S2) ist vorhanden. Entnommen aus [20].

Die Anknüpfung des eintretenden dNTPs an die 3´-Hydroxylgruppe des Primers findet durch nukleophile Substitution unter Abgabe von Pyrophosphat statt. Ein nukleophiler Angriff der 3´-Hydroxylgruppe des Primerterminus wird auf das α-Phosphat des dNTPs durchgeführt (Abbildung 3). Zwei Magnesiumionen erhöhen die Elektrophilie des α -Phosphats des dNTPs. Sie werden dabei von Carboxylatresten der DNA-Polymerase koordiniert [21].

Verschiedene Methoden werden benutzt um die kinetischen Parameter dieser Reaktion zu beschreiben. Steady-state Kinetiken (nach *Michaelis* und *Menten*) ermitteln die Parameter, die die gesamte Reaktion berücksichtigen, d.h. von der Bindung bis zur Dissoziation des Substrates. Eine andere Methode, unter pre-steady-state Bedingungen, misst die Umsetzung eines einzelnen Nukleotides. Dadurch kann die tatsächliche Reaktionsgeschwindigkeit, unabhängig von Bindung und Dissoziation vom Substrat, ermittelt werden [22].

1.3 DNA-Schäden und DNA-Reparatursysteme in Säugetieren

Die DNA ist in der Zelle Schadstoffen und Strahlung ausgesetzt. Dadurch können DNA-Schäden entstehen, die repariert werden müssen, um die genetische Information korrekt zu erhalten [8, 23]. Bei erwachsenen Menschen können pro Tag bis zu 10^{16}-10^{18} Reparatur-Ereignisse an der DNA stattfinden. Wenn man bedenkt, dass wenige Mutationen zur Entstehung von Krebs führen könnten, wird man die entscheidende Rolle eines robusten Reparatursystems in der Zelle klar [23].

DNA-Schäden können sowohl durch endogene als auch durch exogene Faktoren entstehen. Der Angriff endogener Faktoren, wie Stoffwechselprodukten oder freien Radikalen, kann die Hydrolyse und die Oxidierung der DNA verursachen. Die Hydrolyse kann sowohl an der Nukleobase, als auch an der glykosidische Bindung zwischen Nukleobase und Zucker stattfinden. Die am häufigsten vorkommende Hydrolysereaktion an der Nukleobase führt zu einer die Deaminierung von Cytosin. Dadurch wird dieses zu Uracil überführt. U:G Fehlpaarungen können zu einer C:G nach T:A Transition führen. Die hydrolytische Deaminierung von Cytosin erfolgt 100 bis 500 mal pro Zelle pro Tag [24]. Die Hydrolyse an der glykosidische Bindung zwischen Nukleobase und Zucker bewirkt den Verlust der genetischen Information und hinterlässt eine abasische Stelle. Diese Reaktion ist relativ häufig, mit ca. 10 000 Ereignissen pro Zelle pro Tag [25].

Die Oxidation wird hauptsächlich von Stoffwechselprodukten wie ROS (Reactive oxygen species oder reaktive Sauerstoff-Spezies) verursacht. Die meist verbreiteten oxidativen DNA-Modifikationen sind 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-oxo-dG) und 5,6-Dihydroxyl-5,6- Dihydrothymidin (Thymin-Glykol). 8-oxo-dG kann mutagen mit Adenin paaren und dadurch G:C zu T:A Transversionen verursachen. Thymin-Glykol kann die Replikation blockieren. Diese Läsionen entstehen ca. 1000 bzw. 500 mal pro Zelle pro Tag [26-29].

Die oben genannten Schäden werden hauptsächlich durch die Basenexzisionsreparatur (BER) korrigiert (siehe Abbildung 4 und 1.3.1).

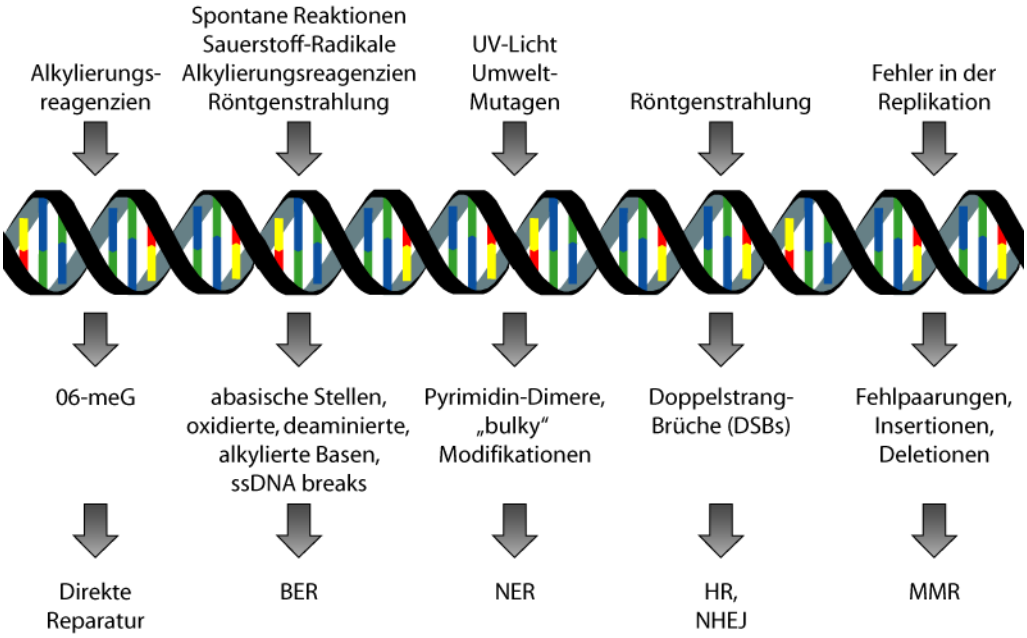


Abbildung 4: Häufige DNA-Schadstoffe, DNA-Schäden und deren Reparaturmechanismen in Säugetieren. Modifiziert aus [23].

Exogene Einflüsse, wie z.B. Umweltfaktoren, UV-Licht oder mutagene Stoffe können „bulky" DNA-Addukte verursachen. Zum Beispiel stellen Thymidin-Dimere, das Produkt der Dimerisation zweier benachbarter Thymidine, eine starke Blockade der Replikation dar [30]. Diese Läsionen werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt. Röntgenstrahlen verursachen Doppelstrangbrüche, die durch Homologe Rekombination (HR) oder Nonhomologous-End-Joining (NHEJ) repariert werden können (siehe Abbildung 4) [8].

Mutationen in der genetischen Information können allerdings auch während der Replikation oder Rekombination erfolgen. Hier sind die DNA-Polymerasen selbst die Quelle von Fehlern. In *E.coli* findet pro Zellteilung ein Fehler alle 10^9-10^{10} duplizierten Basen statt [7, 31, 32]. Die entstandenen Fehler müssen folglich post-replikativ repariert werden. Der Mechanismus der in der Zelle diese Aufgabe erfüllt wird als Mismatch Repair (MMR) bezeichnet [33].

1.3.1 Die Polβ und die Basenexzisionsreparatur (BER)

Die Polβ wurde zum ersten Mal 1971 als niedermolekulare DNA-abhängige DNA-Polymerase beschrieben [34, 35]. Polβ gehört zur X-Familie der DNA-Polymerasen, mit einer hohen Homologie zur Polλ [9]. Sie besteht aus 335 Aminosäuren, besitzt keine intrinsische Exonuklease-Aktivität und weist zwei Domänen auf, eine N-terminale Lyase- und eine C-terminale Polymerase-Domäne [36, 37]. Sie ist die kleinste humane DNA-Polymerase (39kDa), die bislang entdeckt worden ist. Die erste Kristallstruktur einer DNA-Polymerase im Komplex mit Primer/Templat-Komplex und dem eintretendem dNTP, dem so genannten ternären Komplex, wurde 1994 gelöst und beschrieb die Struktur der Polβ der Ratte [38]. Seitdem wurden verschiedene Kristallstrukturen der Polβ mit verschiedenen Liganden gelöst [39-44]. Wegen ihrer einfachen und wohlbekannten Struktur gilt sie oft als Modell für Nukleotydil-Transferase Studien. Eine schematische Darstellung der Struktur dieses Proteins ist in Abbildung 5 dargestellt.

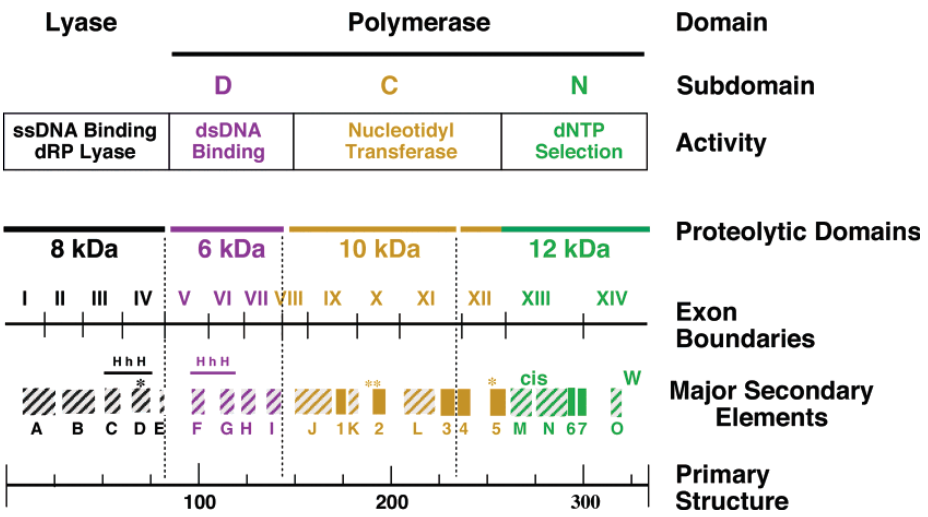


Abbildung 5: Schematische Struktur der Polβ. Die gestreiften (α-Helix) und vollen Balken (β-Faltblatt) zeigen die sekundäre Struktur des Proteins. HhH bezeichnet ein helix-hairpin-helix Motif. Die Asterisken (*) zeigen die Positionen von wichtigen Aminosäuren in der Sequenz: Lys72, Asp190, Asp192 und Asp256. Entnommen aus Referenz [45].

Die N-terminale Lyase-Domäne (8kDa) ist durch eine Protease-empfindliche Region mit der Polymerase-Domäne (31kDa) verbunden [9]. Die N-terminale Domäne ist für

die Bindung an einzelsträngige DNA verantwortlich, während die Polymerase-Domäne die Bindung an doppelsträngige DNA vermittelt [38].

Polβ, ähnlich zu anderen bekannten DNA-Polymerasen, weist die typische Struktur einer Hand auf, mit Handfläche, Finger und Daumen-Subdomänen [38, 46-51]. Die Struktur der DNA-Polymerasen der X-Familie ist allerdings einzigartig, da die Topologie an eine linke statt an eine rechte Hand erinnert. Die Handfläche trägt das aktive Zentrum mit den für die Aktivität der Polymerase notwendigen Aspartate, die zwei Metallionen komplexieren, nämlich Asp190, Asp192 und Asp256. Der Nomenklatur einer rechten Hand entsprechend, sind die Daumen-Subdomäne für die Bindung der doppelsträngigen DNA verantwortlich, während die Finger-Subdomäne die Bindung des eintretendes dNTPs vermittelt [52].

Lange nach der Entdeckung dieses Enzyms war nicht klar, welche Rolle es in der Zelle haben sollte. 1994 wurde bewiesen, dass das Ausschalten („Knock-out") vom Polβ Gen in Mäusen die Letalität der Embryos verursacht, was auf eine wichtige Rolle dieses Enzyms während der fötalen Entwicklung hindeutet [53]. 1996 wurde entdeckt, dass die Polβ in der Basenexzisionsreparatur involviert ist, da die Polβ „knock-out" Maus-embryonale Fibroblasten (MEFs) auf DNA-Alkylierungsstoffe sehr empfindlich sind [54].

BER wird als das Hauptreparatursystem der DNA in Säugetierzellen betrachtet. Dadurch werden mehr als 60 verschiedene Arten von DNA-Schäden behoben (für einige Beispiele siehe 1.3) [55, 56].

BER ist nicht nur in der Behebung von DNA-Schäden, sondern auch in der Beseitigung von z.B. G:T und G:U Fehlpaarungen involviert [57, 58]. Eine G:T Fehlpaarung kann z.B. durch die Deaminierung von 5-Methyl-Cytosin entstehen, während dUMP entweder nach spontane Deaminierung des Cytosins oder durch den Fehleinbau von dUTP gegenüber dAMP während der Replikation entstehen kann [59]. Durch BER wird dUMP entfernt [54, 60] und dCMP gegenüber G eingebaut [61, 62].

Die glykosidische Bindung der beschädigten Base wird entweder spontan durch nicht-enzymatische Hydrolyse oder durch eine DNA-Glykosylase entfernt [63]. Dadurch

entsteht eine abasische Stelle (AP-site).

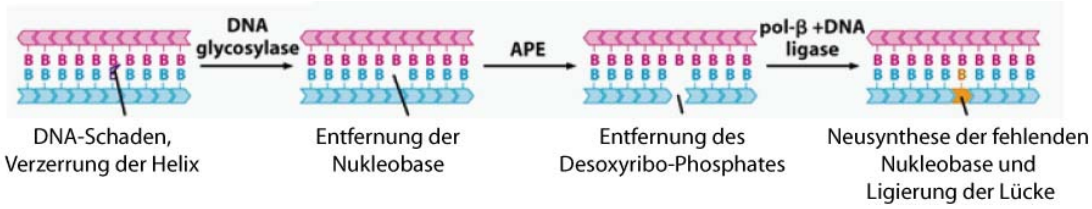


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur. Modifiziert aus [64] **.**

Verschiedene Glykosylasen können, abhängig von dem vorhandenen Schaden, rekrutiert werden [62]. Die verantwortlichen Glykosylasen für die Erkennung der oben genannten Fehlpaarungen sind die Uracil DNA-Glykosylase (UDG) und die Thymin DNA-Glykosylase (TDG). Eine weitere DNA-Glykosylase ist z.B. OGG1, die das Produkt der Oxidierung des Guanins (8-oxo-G) aus der DNA entfernt.

Das Phosphat-Rückgrad an der abasischen Stelle wird anschließend am 5´-Terminus des Zuckers von einer AP-Endonuklease (AP-E) geöffnet, welches eine freie Hydroxylgruppe am 3´-Terminus und eine Phosphatgruppe am 5´-Ende hinterlässt [18, 65].

Die Neusynthese der fehlenden Base sowie die Entfernung der Desoxyribose-Phosphat-Gruppe werden von der Polymerase- bzw. Lyase-Domäne der Polβ durchgeführt. Die DNA-Ligase III schließt die Lücke zwischen der neusynthetisierten Base und der restlichen DNA.

Eine Variante dieses Weges, nämlich die „long-patch“ BER, verursacht die Entfernung von 2 bis 10 Nukleotiden [66]. Weitere Proteine, wie Flap-Endonuklease (FEN-1), “proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), „replication protein A“ (RPA) und „replication factor C“ (RFC) sind darin involviert. Polδ bzw. Polε schließen die Lücke, und anschließend werden die DNA-Stränge von der DNA-Ligase I verknüpft.

Die wichtige Rolle der Polβ in der DNA-Reparatur wurde betont, als *Sweasy* verschiedene Varianten der Polβ entdeckte, die in mehr als 35% aus 90 untersuchten Krebsarten vorgefunden worden sind. Diese Varianten wiesen eine veränderte Genauigkeit vor, die selbst zu Mutationen führen konnte und vermutlich für die Entstehung dieser Krebsarten mitverantwortlich sind [67-74].

1.4 Bypass von DNA-Schäden bei DNA-Polymerasen

Die Reparatur eines DNA-Schadens kann nur stattfinden, wenn sich die betroffene DNA nicht in der Replikation befindet. Kann der Schaden vom Replikationsapparatus nicht behoben werden, ist eine Blockade der Replikation möglich, die in extremen Fällen zur Apoptose führen kann [23]. Eine Lösung zu diesem Problem ist das Überlesen dieser Schäden von einer spezialisierten DNA-Polymerase. Dieser Prozess ist fehleranfällig, wobei Basensubstitutionen, Deletionen oder Insertionen (-1 oder +1 Frameshifts) entstehen können. Die Korrektur dieser Mutation kann nach der Replikation erfolgen. Im Fall vom Schaden-Bypass wird die replikative durch eine „Translesion" DNA-Polymerase (TLS-Polymerase) an der Replikationsgabel ausgetauscht, die eine Überlesefunktion besitzt [75, 76]. Nach der Synthese über den Schaden wird die TLS-Polymerase wieder durch die replikative Polymerase ersetzt und die Replikation kann fortgesetzt werden [11]. Die meisten TLS-Polymerasen sind der Familie Y zugeordnet.

Durch die Lösung der ersten Kristallstrukturen von TLS-Polymerasen wurde es deutlich, dass diese Enzyme ein weiteres und flexibleres aktives Zentrum als die replikativen Polymerasen besitzen, welches die Prozessierung dieser Läsionen ermöglicht [11, 51, 77]. In der Tat ist oft eine veränderte DNA-Konformation vorhanden, die durch das Vorhandensein einer Läsion verursacht wird. Oft besitzen diese Polymerasen auch eine geringere Genauigkeit in der Gegenwart unbeschädigter DNA, was aber auch Folge der abwesenden Korrekturlesefunktion ist. Diese geringe Genauigkeit erfordert eine sehr starke Kontrolle dieser Enzyme in der Zelle, weil sie nur im Fall eines DNA-Schadens eingesetzt werden dürfen [11]. Der Prozessivitätsfaktor PCNA spielt eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang. Die Monoubiquitinierung dieses Komplexes am Lysin164 führt zur Aktivierung des RAD6-pathways und zur fehleranfällige Überlesefunktion über die DNA-Polymerase η und ξ [78].

Jede TLS-Polymerase besitzt ein besonderes Spektrum von DNA-Schäden, worüber sie lesen kann [10]. Zum Beispiel kann die humane DNA-Polymerase η über Thymidin-

Dimere, Cisplatin- und Acetylaminofluorene-Addukte lesen, während sie von 6-4-TT Photoprodukte oder einige N2-Guanin-Addukte inhibiert wird [79].

Die abasischen Stellen sind die am meisten verbreiteten Läsionen in der Zelle (10 000 pro Tag pro Zelle [45]) und sie repräsentieren eine sehr starke Blockade der Replikation [80]. Es ist noch nicht geklärt, welche DNA-Polymerase für das Überlesen der abasischen Stellen verantwortlich ist. Oft ist die „Translesion synthesis" ein Prozess, der zwei DNA-Polymerasen benötigt. Eine DNA-Polymerase ist für den Einbau gegenüber der Läsion verantwortlich, während eine zweite, meistens die DNA-Polymerase ξ (Polξ), die Verlängerung nach dem Schaden übernimmt [81, 82]. Dies ist wahrscheinlich auch für die abasischen Stellen zutreffend, wobei verschiedene DNA-Polymerasen, nämlich Polκ, Polι und Rev1, für den Einbau gegenüber der Läsion verantwortlich zu sein scheinen [10, 81-88].

Die DNA-Polymerase κ (Polκ), ein Mitglied der Familie Y, kann über eine abasische Stelle synthetisieren. Allerdings ist der Bypass uneffektiv und sehr abhängig vom Templat-Kontext. Die Effizienz des Überlesens wird jedoch in der Gegenwart von PCNA und RP-A gesteigert. Dennoch bleibt es zweifelhaft, ob diese DNA-Polymerase tatsächlich verantwortlich für den Bypass ist [84-86].

Die DNA-Polymerase ι (Polι) kann ebenfalls einen Bypass über verschiedene DNA-Schäden durchführen, wie z.B. 6-4-TT Photoprodukte und die abasischen Stellen. Jedoch kann diese Polymerase nur ein Nukleotid gegenüber der Läsion einbauen und keine Verlängerung durchführen [81, 88].

Rev1 DNA-Polymerase wird auch dCMP-Transferase genannt, weil sie nur dCTP gegenüber der abasischen Stelle einbauen kann. Für Polι und Rev1wird die Polξ für die Verlängerung verantwortlich gemacht [87].

Meistens ist das Überlesen mit der Entstehung einer minus 1-Leserasterverschiebung bedingt durch eine Deletion verbunden. Dieses Verhalten im Bypass einer abasischen Stelle ist für mehrere DNA-Polymerasen bekannt, wie z.B. mehrere TLS-Polymerasen der Familie Y, wie die Polκ [84-86], *Dpo4* DNA-Polymerase [89], die *Dbh* DNA-Polymerase [90] und die DNA-Polymerase IV aus *E. coli* [91]. Für die *Dpo4* DNA-Polymerase ist es bewiesen worden, dass die abasische Stelle aus der Doppelhelix

geschoben wird, und dass das eintretende dNTP mit der ersten Base abwärts im Templat paart [89].

1.5 Selektivität und Genauigkeit von DNA-Polymerasen

Damit die Biokatalyse einer Reaktion erfolgen kann, müssen Enzyme das richtige Substrat erkennen und es zum Produkt umsetzen können. Meistens weisen Enzyme eine hoch spezifische Substraterkennung auf. DNA-Polymerasen sind besondere Enzyme, weil sie zwei Substrate, das Templat und das eintretende dNTP erkennen müssen. Außerdem müssen sie das richtige dNTP aus einem Pool von vier verschiedenen, aber doch sehr ähnlichen Substraten, auswählen. Diese Auswahl erfolgt nach den bekannten „*Watson* und *Crick* Regeln", wobei ein Thymin immer mit einem Adenin und ein Cytosin mit einem Guanin paart. Dieser Prozess, Selektivität genannt, ist kritisch für die Erhaltung der intakten genomischen Information. DNA-Polymerasen mit einer hohen Genauigkeit weichen dieser Regel nur einmal pro 10^5-10^6 synthetisierte Phosphorsäurediester-Bindungen ab [7, 11, 92-96]. Eine so hohe Genauigkeit kann allerdings nur mithilfe der intrinsischen Korrekturlese-Funktion dieser Enzyme (3´-5´-Exonuklease-Aktivität oder „Proofreading") erreicht werden, die falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernt [7]. Einige DNA-Polymerasen, die hauptsächlich in der Reparatur der DNA involviert sind, weisen allerdings eine niedrige Genauigkeit auf [3, 7, 10, 92]. Die Gründe dieser Unterschiede sind noch nicht genau erforscht und immer noch eine Diskussionsfrage [97]. Fehler in der durch DNA-Polymerasen-katalysierten Reaktion ergeben sich aus dem Fehleinbau eines nicht-kanonischen dNTPs und aus der folgenden Verlängerung. Dies führt zu einer Basensubstitution. Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, um den Mechanismus der Selektivität zu erklären [7, 11, 92-96]. Auf den ersten Blick ist die Bildung verschiedener Wasserstoffbrückenmuster zwischen den Nukleobasen vom Templat und eintretendem dNTP für diese Genauigkeit verantwortlich. Dennoch, auf der Basis von Studien der Temperatur-abhängigen Denaturierung von komplett komplementären im Vergleich zu „fehlgepaarten" DNA-

Strängen wurde klar, dass die hohe Selektivität nicht alleine dieser Energieunterschiede zugeschrieben werden kann [92, 98]. Sogar konnte in letzter Zeit bewiesen werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen für einige DNA-Polymerasen nicht grundsätzlich benötigt werden, um eine hohe Selektivität zu erzielen [93, 97]. Das genaue Fitting des Watson-Crick Basenpaares in das aktive Zentrum ist vermutlich ein wichtiger Faktor für die beobachtete Selektivität („Active site tightness").

Die Selektivität von DNA-Polymerasen variiert sehr stark in Abhängigkeit der untersuchten DNA-Polymerase [3, 10, 93]. Die Herkunft dieser Eigenschaft ist noch nicht geklärt worden, auch wenn spekuliert wird, dass Variationen in der Spannung („tightness") des aktiven Zentrum dafür verantwortlich sind [93, 99-109].

Außer Fehleinbauten können andere Arten von Fehlern während der Polymerisationsreaktion entstehen, wie z.B. die Verschiebung des Leserasters („Frameshift") durch Insertionen oder Deletionen [7, 94, 110]. Der Mechanismus, der die Substitution von Nukleotiden steuert, ist allerdings besser verstanden, als die Entstehung von Frameshifts [110]. Die falsche Anlagerung vom Primer und Templat („Misalignment") wird oft als Grund für dieses Verhalten zitiert [7, 94, 110, 111]. Neuere Studien konnten zeigen, dass die Genauigkeit in der Primer/Templat Anlagerung von der DNA-Polymerase abhängig ist und um mehr als das 1000-fache unter verschiedenen DNA-Polymerasen variiert [110]. Zum Beispiel ist die Polβ im Falle von Einzeldeletionen weniger genau als das Klenow Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (KF(exo-) [111-113]. Viele Studien zeigen, dass DNA-Polymerasen komplexe Kontakte mit Primer, Templat und eintretendem dNTP bilden, die sich über mehrere Basenpaaren außerhalb des aktiven Zentrums erstrecken können [111-120]. Diese Interaktionen finden hauptsächlich mit dem Zucker-Phosphodiester-Rückgrat in der kleinen Furche und mit den Nukleobasen statt. Strukturanalysen zeigen, dass die Polβ, im Vergleich zum KF(exo-) weniger Kontakte mit dem Primer/Templat-Komplex aufwärts vom aktiven Zentrum eingeht [7, 45]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kontakte zum Primer/Templat-Komplex eine bedeutende Rolle in der Genauigkeit durch die Primeranlagerung („Misalignment fidelity") spielen. DNA-Polymerasen, die eine höhere Genauigkeit zeigen, könnten möglicherweise eine festere Bindungstasche

bilden, die weniger geometrische Abweichungen erlaubt (wie z.B. einen falsch angelagerten Primer/Templat-Komplex). So könnten „Frameshifts“ vermieden werden, die aus Deletionen oder Insertionen stammen. Hingegen könnten weniger genaue DNA-Polymerasen eine höhere Flexibilität im aktiven Zentrum vorweisen, die solche Abweichungen besser zulassen und zu einer verringerten Genauigkeit führen. Die DNA-Polymerase λ, ebenfalls eine DNA-Polymerase der Familie X, besitzt eine höhe Deletionsrate. Einige Studien zeigen in der Tat, dass diese Polymerase ein flexibleres aktives Zentrum vorweist, das sogar ein extra-helikales Nukleotid im falsch angelagerten Primer/Templat-Komplex unterbringen kann [121, 122].

In den letzten Jahren wurden verschiedene modifizierte DNA-Substrate entwickelt, um die sterischen Einschränkungen von DNA-Polymerasen zu analysieren. *Kool et al.* haben in den letzten Jahren Analoga des Thymins entworfen, die sich stufenweise in Größe und Polarität unterscheiden, um die Auswirkungen dieser Parameter an der Nukleobase zu analysieren [104-109]. Nicht-polare Analoga, die weniger Wasserstoffbrückenbindungen als ein unmodifiziertes Thymin eingehen konnten, wurden eingesetzt. Die Größe der Nukleobase wurde schrittweise durch die Substitution des Sauerstoffes des Thymins mit einem Halogenen gesteuert. Hingegen haben *Marx et al.* in den letzten Jahren 4´C-Alkyl-modifizierte Nukleotide zur Analyse der sterischen Effekte an der Desoxyribose verwendet [100-103, 119, 123, 124]. Alkylgruppen wurden ausgewählt, weil somit die Effekte auf die Wasserstoffbrückenbindungen und auf die Konformation der Nukleotide minimiert wurden. Beide Ansätze zeigen, dass die sterischen Effekte eine wichtige Rolle in der Selektivität von DNA-Polymerasen spielen und dass Variationen dieser sterischen Einschränkungen zur Klärung der Unterschiede in der Selektivität verschiedener Enzyme beitragen können.

1.6 Gerichtete Evolution von DNA-Polymerasen

DNA-Polymerasen sind lebenswichtige Enzyme, die die bedeutsame Aufgabe tragen, das Genom zu replizieren und intakt zu halten. Außerdem sind DNA-Polymerasen

wertvolle Werkzeuge, die nicht mehr aus der molekularbiologische Forschung zu denken sind. Zahlreiche Methoden und deren Anwendungen, wie z.B. die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR), Klonierungen von Genen, Sequenzierungen und DNA-Analysen usw., basieren auf den Eigenschaften einiger DNA-Polymerasen. Immer mehr technische Anwendungen haben es notwendig gemacht, neue Varianten von DNA-Polymerasen zu finden, die verbesserte Eigenschaften besitzen. Nicht nur rationales Design, sondern auch die gerichtete Evolution wurde oft in den letzen Jahren erfolgreich angewendet, um Mutanten mit erhöhtem Substratspektrum oder Proteinstabilität zu finden [125-134]. Die gerichtete Evolution wurde ebenfalls verwendet, um Erkenntnisse über Mechanismus und Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion zu gewinnen [135].

Unter gerichtete Evolution versteht man die Veränderung eines Proteins oder Enzyms *in vitro* durch eine zufallsbasierte Mutagenese und die anschließende Identifizierung interessanter Mutanten (Abbildung 7). Großer Vorteil dieser Methode im Vergleich zur zielgerichteten Mutagenese ist, dass keine genauen Kenntnisse der Struktur des Proteins und seines Reaktionsmechanismus notwendig sind.

Die gerichtete Evolution basiert auf der iterativen Wiederholung verschiedener Schritte: Einbringen der Variabilität, Identifizierung der Mutanten mit erwünschten Eigenschaften durch Screening oder Selektion und Isolierung der interessanten Treffer, die eventuell als Startpunkt für eine weitere Runde Evolution dienen können (Abbildung 7).

Die Variabilität wird meistens in einem PCR-basierten Verfahren (fehleranfällige oder „error-prone“ PCR) erreicht, wobei eine DNA-Polymerase mit verringerter Genauigkeit für die Amplifizierung des für das Protein codierenden Gens verwendet wird. Möglich ist dabei sowohl die Randomisierung des kompletten Gens, als auch nur die Mutagenese eines kleineren Bereichs. Verschiedene Methoden werden angewendet, um diese Ungenauigkeit zu erzielen, wie z.B. die Verwendung von Mutanten der *Taq* DNA-Polymerase (z.B. GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Stratagene), oder die Zugabe von Mn^{2+}-Ionen und unbalancierten dNTP-Mengen [136-138]. Andere Möglichkeiten stellen z.B. die Rekombination mehrerer Gene („DNA shuffling“) oder die Verwendung

von Wirtorganismen dar, die fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen besitzen (z.B. *E. coli* XL1-Red, Stratagene) [139-141].

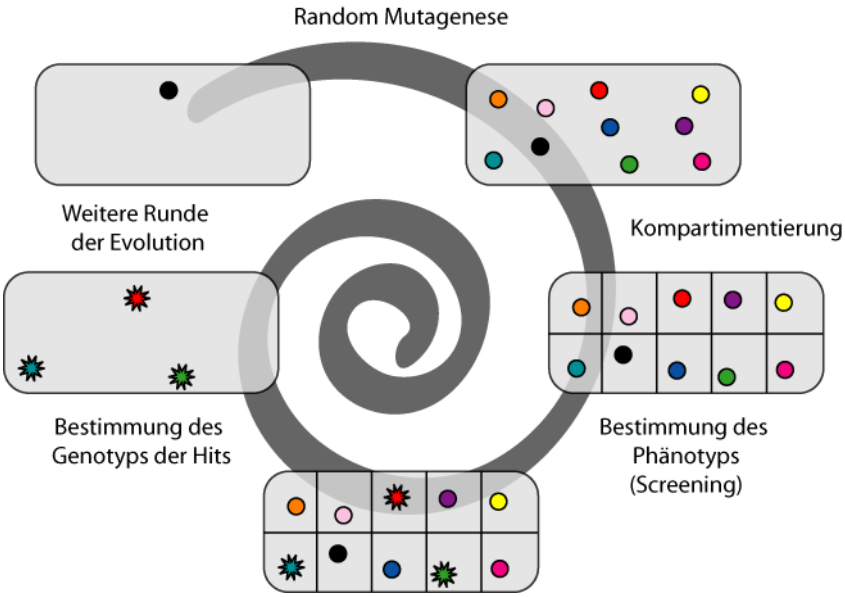


Abbildung 7: Graphische Darstellung der gerichteten Evolution eines Enzyms mittels Screeningverfahren. Der Wildtyp, in schwarz dargestellt, geht eine Random Mutagenese ein. Die Einzelvarianten werden räumlich getrennt. Die Varianten werden gescreent und die Treffer werden entweder untersucht, oder dienen als Templat für eine weitere Runde Mutagenese.

Die somit erhaltene Mutantenbibliothek kann dann auf die gewünschte Eigenschaft getestet werden. Zwei verschiedene Ansätze können dafür verwendet werden, das Screening oder die Selektion [135]. Bei beiden Systemen muss die Verknüpfung zwischen Phänotyp und Genotyp gewährleistet sein. Im Screeningverfahren wird dies meistens durch räumliche Trennung erreicht (Kompartimentierung) und die Funktion der einzelnen Varianten kann anschließend untersucht werden. Oft anspruchsvoll ist die Optimierung der Screeningreaktion, die meistens auf spektroskopischen Verfahren beruht. Vorteil dieser Methode ist die Genauigkeit der Aussage und die höhere Kontrolle der Reaktionsbedingungen. Nachteil ist die geringe Anzahl an Mutanten, die untersucht werden können. Bibliotheken bis zu 10^5 Mutanten können mit einem Screeningverfahren durchmustert werden [135]. Erfolgreiche Beispiele dieser Art der gerichteten Evolutionen sind in der Literatur vorhanden [131-134, 142-144].

Das *in vivo* Selektionsverfahren basiert auf der Eigenschaft, dass nur die Varianten mit der erwünschten Funktion einen Überlebensvorteil einem Wirtsorganismus vermitteln können. Meistens wird dies durch genetische Komplementierung von Organismen erreicht, die eine Defizienz in einem besonderen Stoffwechselweg besitzen [127]. Verschiede Beispiele von Komplementierung mit DNA-Polymerasen wurden von *Loeb et al.* in den letzten Jahren veröffentlicht [145-148]. Der *E. coli* Stamm SC18-12 besitzt eine temperaturempfindliche DNA-Polymerase I, die bei 30°C aktiv und bei 37°C inaktiv ist. Nur die Bakterien, die eine aktive rekombinante DNA-Polymerase exprimieren, können bei 37°C überleben. Vorteil dieser Methode ist die Anzahl an Mutanten, die gleichzeitig durchmustert werden können. Die *in vivo* Selektion weist allerding einen entscheidenden Nachteil auf, nämlich die Entstehung adaptiver Stämme, die trotz genetischen Defiziten wachsen können und falsch positive Ergebnisse zeigen [127].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der *in vitro* Selektion. Die bekanntesten Beispiele dafür sind das Phagen-Display und die kompartimentierte Selbstreplikation („compartmentalized self-replication“, CSR).

Das Phagen-Display bezeichnet die Methode, die erlaubt, Proteine oder Peptide an der Oberfläche eines Phagen zu präsentieren. In der Tat wird das zu untersuchende Protein als Fusionskonstrukt mit einer verkürzten Form des Hüllproteins pIII (*minor coat protein*) verknüpft, das an der Oberfläche exponiert wird. *Romesberg et al.* konnten ein System zur Evolution von DNA-Polymerasen entwickeln [129, 149]. Auf demselben Phagen werden sowohl eine Mutante einer DNA-Polymerase als auch ein „saures“ Peptid präsentiert (Abbildung 8). Das „saure“ Peptid wird benutzt, um den mit einem „basischen“ Peptid gekoppelten Primer/Templat-Komplex in räumliche Nähe zur Polymerase zu bringen. Eine aktive DNA-Polymerase ist nun in der Lage, den Primer/Templat-Komplex zu prozessieren. Der Einbau von biotinylierten dNTPs wird benutzt, um die Phagen zu isolieren, die eine aktive Mutante tragen. Auch in diesem Fall können weitere Runden von Evolution erfolgen.

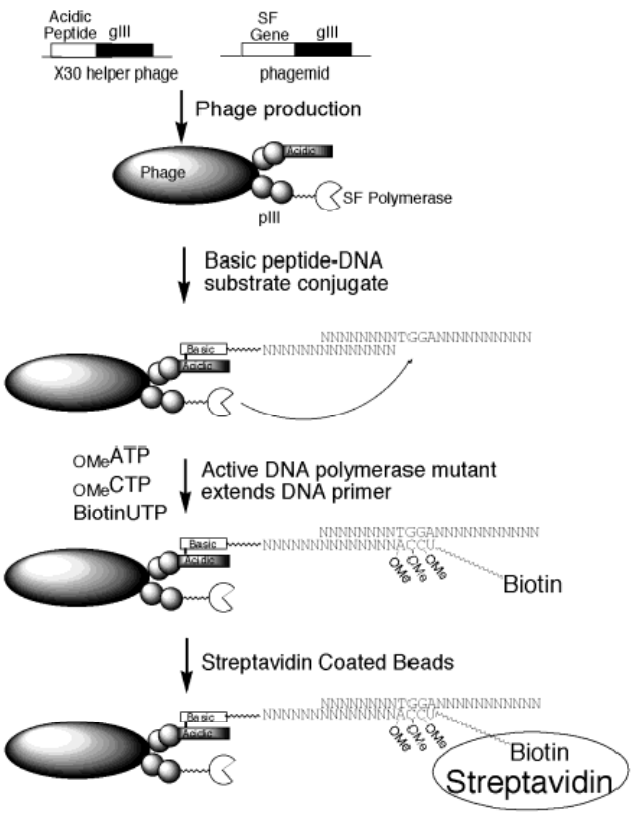


Abbildung 8: Schematische Darstellung der *in vitro* Selektionsmethode des Phagen-Displays. Entnommen aus [129].

Vorteil der Methode ist, wie in allen Selektionsverfahren, die große Anzahl der Mutanten, die in kürzester Zeit untersucht werden können. Nachteil ist die Tatsache, dass die Größe des Proteins einen großen Einfluss auf die Präsentierung an der Oberfläche eines Phagen hat und nicht alle Proteine exponiert werden können. Außerdem muss ein Protein immer ein Fusionskonstrukt sein, das ins Periplasma der *E. coli* sezerniert werden muss [150].

Bei der CSR wird eine thermostabile Wasser-in-Öl Emulsion hergestellt, um die Kompartimentierung zu erzielen. Wassertröpfchen von 15µm Durchmesser werden mithilfe von Detergenzien in Mineralöl dispergiert. In einem Tröpfchen sollte sich im Idealfall nur eine Bakterienzelle befinden, die eine Variante einer DNA-Polymerase überexprimiert. Diese Lösung enthält zusätzlich Reaktionspuffer, für die Sequenz der Polymerase spezifische Primer, dNTPs, bivalente Metallionen und RNase. Ein Denaturierungsschritt lysiert das Bakterium und vernichtet gleichzeitig die *E. coli*-eigenen DNA-Polymerasen. Dabei wird das überexprimierte Enzym freigesetzt. Nur die

aktiven Mutanten sind jetzt in der Lage, das eigene Gen zu amplifizieren. Mehrere PCR-Zyklen werden gefahren.

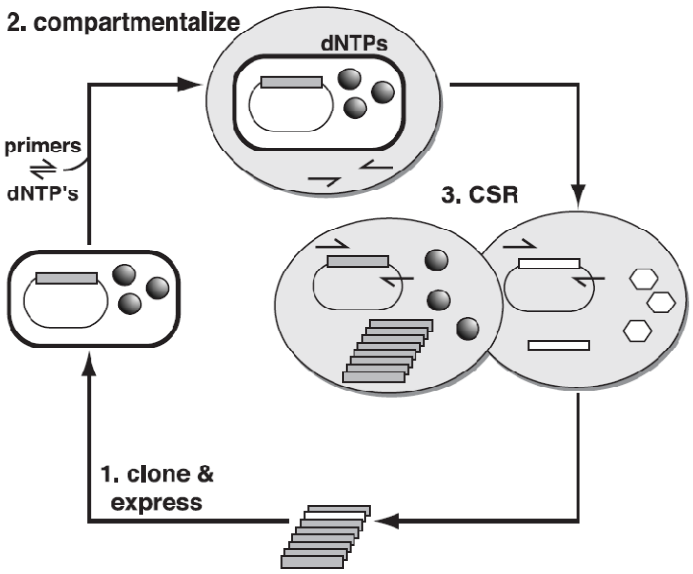


Abbildung 9: Schematische Darstellung der *in vitro* Selektionsmethode des CSR. Entnommen aus [128].

Auf diese Weise reichert sich nun die DNA an, die für aktive Polymerasen-Mutanten codiert. Diese DNA wird am Ende der Reaktion aufgereinigt und eventuell in eine weitere Runde Evolution eingesetzt. *Holliger et al.* konnten mit dieser Methode erfolgreich Mutanten von DNA-Polymerasen evolvieren [128, 151]. Vorteil dieser Methode ist die große Anzahl von Mutanten (10^8-10^9), die gleichzeitig durchmustert werden können. Allerdings ist dieses Verfahren nur für thermostabile Enzyme verwendbar.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der humanen DNA-Polymerase β. Verschiedene Aspekte der Substratakzeptanz wurden mithilfe von zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zum einen sollten die sterischen Zwänge im aktiven Zentrum und deren möglichen Auswirkungen auf die Genauigkeit des Enzyms untersucht werden. Die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Primer/Templat-Komplex und mit dem eintretenden dNTP sollten unter Anwendung chemisch modifizierter Sonden analysiert werden, die eine Vergrößerung durch eine Alkylgruppe an der 4´C-Position trugen. Als Vergleich sollte dieselbe Untersuchung mit einem anderen Enzym durchgeführt werden, dem Klenow Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (3´-5´-exonukleasedefizient), das zur Polymerasen-Familie A gehört.

Zum anderen wurde, mithilfe einer gerichteten Evolution, eine Variante der Polβ gesucht, die eine erhöhte Akzeptanz von DNA-Schäden vorweisen konnte. Der Mechanismus, wie einige DNA-Polymerasen DNA-Schäden replizieren können (z.B. Polη oder andere Polymerasen aus der Y-Familie) ist noch nicht vollkommen erfasst. Hierfür sollte eine DNA-Polymerase, die keine Überlesefunktion besitzt, in eine Polymerase umgewandelt werden, die in der Lage ist, einen Bypass über geschädigte DNA durchzuführen, um weitere Erkenntnisse über diese Fähigkeit zu gewinnen. Aus den verschiedenen DNA-Schäden wurde für diese Arbeit hauptsächlich die abasische Stelle als Objekt der Untersuchung ausgewählt, eine der am meisten vorkommenden DNA-Läsionen in der Zelle. Dazu sollte zuerst ein Screeningsystem entwickelt werden und eine Mutantenbibliothek sollte hergestellt und durchmustert werden. Die identifizierten Mutanten sollten schließlich charakterisiert werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Untersuchung der entgegengesetzten sterischen Einschränkung des aktiven Zentrums der Polβ und des Klenow Fragments der E. coli DNA-Polymerase I mithilfe von sterischen Sonden

2.1.1 Einleitung

Die Selektivität von DNA-Polymerasen spielt eine entscheidende Rolle in der Erhaltung des Genoms aller Lebewesen. DNA-Polymerasen, die in der Replikation des Genoms involviert sind, weisen eine hohe Selektivität auf, wobei sie eine Fehlerrate von weniger als einen Fehleinbau pro 10^6 synthetisierten Basen zeigen [7, 11, 92-96].

Andere DNA-Polymerasen, die z.B. in der Reparatur von DNA-Schäden involviert sind, zeigen eine deutlich geringere Genauigkeit [3]. Der Ursprung dieser Unterschieden ist immer noch nicht völlig verstanden und ständiges Diskussionsthema [97].

Mutationen in der DNA können u.a. durch den Fehleinbau einer nicht- kanonischen Base und anschließende Verlängerung dieser Fehlpaarung entstehen. Lange wurde behauptet, dass die Entstehung von Wasserstoffbrücken zwischen der Base im Templat und dem komplementären eintretenden dNTP für diese Genauigkeit verantwortlich seien. In den letzten Jahren ist aber in mehreren Studien gezeigt worden, dass diese Wasserstoffbrücken alleine nicht ausreichen, um eine solche Genauigkeit zu erzielen [93, 98, 104-109]. Das genaue „Fitting“ der Basenpaare in der Bindungstasche ist vermutlich einer der wichtigsten Faktoren, die zu dieser Genauigkeit beitragen (siehe 1.5).

Um diese Idee zu testen, wurden zwei verschiedene Polymerasen mithilfe von „sterischen Sonden“ untersucht. Darunter versteht man modifizierte Nukleotide, die die sterischen Eigenschaften der DNA durch eine Substitution in der Struktur der Base oder des Zucker-Phosphat-Rückgrates verändern [152]. Dadurch kann die Beteiligung der Nukleotidgröße als Faktor für die Genauigkeit eines Enzyms untersucht werden. In dieser Studie wurden Nukleotide angewendet, die an der 4´C-Position des Zuckers alkyliert sind (Abbildung 10). Diese Nukleotide, sowohl in der Form eines

Triphosphates, als auch als Phosphoamidit für die Oligonukleotidsynthese, wurden von Dr. Rangam synthetisiert und zu Verfügung gestellt [103].

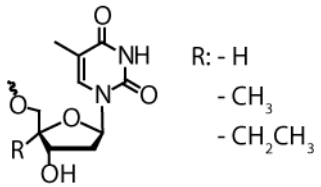


Abbildung 10: Struktur der verwendeten sterischen Sonden.

2008 wurde eine Studie veröffentlicht, wobei die aktiven Zentren des DinB Homologes DNA-Polymerase aus Sulfolobus solfataricus (*Dbh*) und des Klenow Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (3´-5´-exonukleasedefizient, KF(exo-)) mithilfe dieser sterischen Sonden untersucht wurden [103]. Die *Dbh* Polymerase gehört der Familie Y an und ist eine Läsion-Bypass Polymerase. Es wird vermutet, dass Läsion-Bypass-Polymerasen ein flexibleres aktives Zentrum besitzen, das erlaubt, DNA-Schäden zu prozessieren [153]. Die DNA-Polymerase I aus *E. coli* gehört zur A-Familie und ist in der DNA-Reparatur involviert. Die *Dbh* Polymerase und das KF(exo-) weisen eine sehr unterschiedliche Selektivität und Genauigkeit auf. Wie erwartet konnte die unselektivere *Dbh* besser alkylierte Substrate prozessieren, als das genauere KF(exo-). Dadurch konnte die Theorie der „active site tightness" bestätigt werden (für Details siehe 1.5).
Ziel dieser Arbeit war das aktive Zentrum der humanen Polβ mithilfe der sterischen Substrate zu testen. Sowohl der Einbau eines alkylierten dNTP, als auch die Verlängerung eines alkylierten Primers wurden untersucht. Zur Quantifizierung der beobachteten Phänomene wurden pre-steady-state Kinetiken gemessen. Als Vergleich wurde ebenfalls das Klenow Fragment ausgewählt.

2.1.2 Prozessierung von sterischen Sonden durch die Polβ und das KF(exo-)

Um die aktiven Zentren der beiden untersuchten Polymerasen zu prüfen, wurden radiometrische Primerverlängerungsreaktionen mit der Polβ und dem KF(exo-)

durchgeführt. Dafür wurden modifizierte Substrate verwendet, die einen Alkylsubstituent an der 4´C-Position im Zucker trugen (Abbildung 10). Als Substituent wurde entweder eine Methyl- oder ein Ethyl-Gruppe gewählt. Zuerst wurde der Einbau von steigenden Konzentrationen der modifizierten Thymidine getestet (Abbildung 11A). Als Kontrolle wurde die Reaktion mit dem unmodifizierten $dT^{H}TP$ durchgeführt.

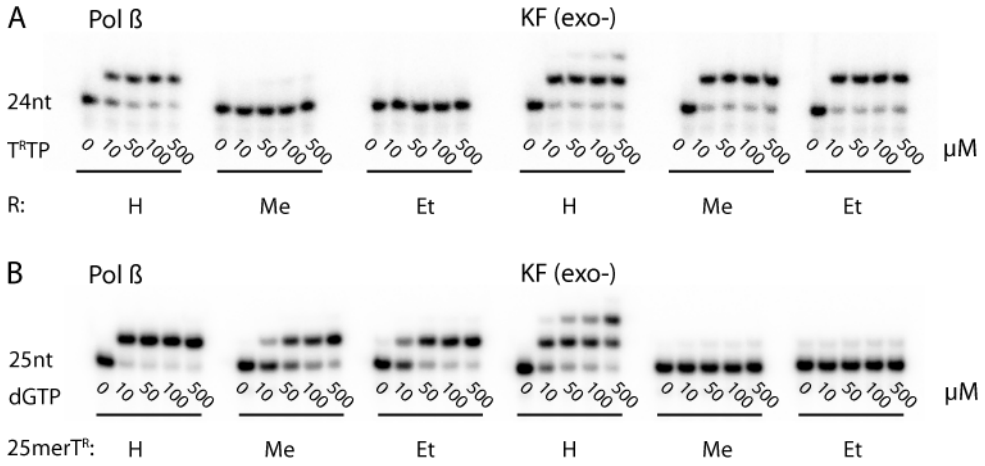


Abbildung 11: Effekte der 4'-Alkylgruppen auf die Primerverlängerung durch Polβ und KF(exo-). (A) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen, die in der Gegenwart der sterischen Sonden $dT^{R}TPs$ durchgeführt wurden. Die Reaktionen enthielten 40nM Primer/Templat-Komplex (Primer: 24merA, Templat: 36mer), 40nM Polβ oder 2nM KF(exo-). Die Konzentration von $dT^{R}TP$ ist in der Abbildung angegeben. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen, die mit modifizierten Primern durchgeführt wurden. Die Reaktionen enthielten 40nM Primer/Templat-Komplex (Primer: $25merT^{R}$, Templat: 36mer), 40nM Polβ oder 2nM KF(exo-). Die Konzentration von dGTP ist in der Abbildung angegeben. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Unter den gewählten Bedingungen konnte die Polβ keines der modifizierten $dT^{R}TPs$ einbauen, während das unmodifizierte $dT^{H}TP$ prozessiert wurde.

KF(exo-) konnte, im Gegensatz dazu, die sterischen Sonden prozessieren und eine Primerverlängerungsreaktion wurde in allen Fällen beobachtet.

Anschließend wurde die Verlängerung eines Primers untersucht, der diese sterischen Sonden am 3´-Primerterminus trug. Die Ergebnisse unterschieden sich für beide Enzyme vom vorherigen Fall (Abbildung 11B). Polβ konnte alle modifizierten Primer deutlich besser verlängern als das KF(exo-), welches kaum in der Lage war, ein Verlängerungsprodukt zu synthetisieren.

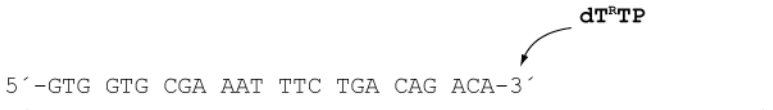
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die aktiven Zentren der beiden

untersuchten Polymerasen in ihrer Struktur unterscheiden. Diese Beobachtungen wurden mithilfe von pre-steady-state Kinetiken quantifiziert.

2.1.3 Pre-steady-state Kinetiken für die Polβ

Für die Charakterisierung der oben vorgestellten Ergebnisse wurde die Inkorporation der modifizierten Nukleotide unter pre-steady-state Bedingungen gemessen. Zuerst wurde der Einzeleinbau von $dT^{R}TP$ in einen Primer/Templat-Komplex untersucht. Diese Experimente wurden in der Sättigung von Enzym im Vergleich zur DNA durchgeführt. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Inkorporationsrate des unmodifizierten $dT^{H}TP$ betrug 3,9 ± 0,1s^{-1}. Die Substrataffinität vom binären Komplex Enzym/DNA zum eintretenden dNTP wurde mit einer K_d von 264 ± 24µM ermittelt (Abbildung 12A und B). Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur vorhandenen Daten [154].

Tabelle 1: Zusammenfassung der kinetischen Parameter des Einzeleinbaus von $dT^{R}TP$ in ein 24merA/36mer Komplex durch Polβ.



	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Polβ	A : $dT^{H}TP$	3,9 ± 0,1	264 ± 24	15 000
	A : $dT^{Me}TP$	0,046 ± 0,006	870 ± 197	53
	A : $dT^{Et}TP$	n.a.	n.a.	n.a.

Sowohl die Geschwindigkeit der Reaktion, als auch die Affinität für das eintretende dNTP wurden durch die Substitution des Wasserstoffes durch eine Methyl-Gruppe an der Position 4´C beeinträchtigt. Die Inkorporationsrate sank um das 100-fache auf 0,046 ± 0,006s^{-1} und die Substrataffinität um das 3-fache auf 870 ± 197µM. Insgesamt wurde die Effizienz der Reaktion durch die Vergrößerung durch eine Methyl-Gruppe

280-fach geringer.

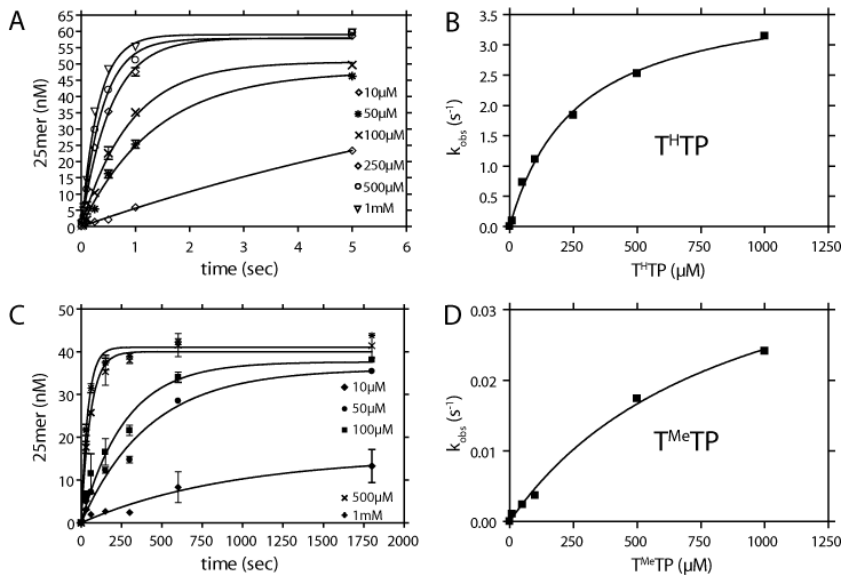


Abbildung 12: Pre-steady-state Kinetiken des Einbaus von $dT^{H}TP$ und $dT^{Me}TP$ in ein 24mer/36mer Primer/Templat-Komplex (100nM) durch die Polβ (1µM). (A und C) Graphische Darstellung von Produkt gegen die Zeit. Die Kurven zeigen die nicht-lineare Regression zu einer exponentiellen Gleichung. Ein Komplex von Primer/Templat und Polβ wurde schnell mit verschiedenen Konzentrationen an $dT^{H}TP$ (A) oder $dT^{Me}TP$ (C) gemischt. (B und D) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration von $dT^{H}TP$ (B) oder $dT^{Me}TP$ (D). Die k_{obs}-Werte wurden gegen die $dT^{R}TP$-Konzentration aufgetragen und mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet.

Die weitere Vergrößerung der Alkylgruppe an der 4´C-Position durch die Einführung einer Ethyl-Gruppe wurde von der Polβ nicht toleriert. Auch bei Konzentrationen an $dT^{Et}TP$ von 1,5mM und drei Stunden Reaktionszeiten wurde kein Einbau beobachtet.

Desweiteren wurden die sterischen Zwänge des aktiven Zentrums am 3´-Primerterminus untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Verlängerung eines Primers gemessen, der die modifizierte Base am 3´-Terminus trug (Abbildung 11A). Gemessen wurde die Inkorporationsrate des Einbaus von dGTP gegenüber Cytosin (Tabelle 2 und Abbildung 14).

Die Polβ zeigte beim unmodifizierten Primer/Templat-Komplex eine Inkorporationsrate von dGTP von 13,8 ± 1,5s^{-1} und eine Substrataffinität von 328 ± 85µM.

Tabelle 2: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der kanonischen Verlängerung eines am 3´-Terminus modifizierten Primers 25merT^{R} in Komplex mit einem 36mer durch Polβ.

dGTP

5´-GTG GTG CGA AAT TTC TGA CAG ACA T^{R}-3´
3´-CAC CAC GCT TTA AAG ACT GTC TGT ACT GTC TGC GTG-5´

	Primer	Templat : dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Polβ	**25merT^{H}**	C : dGTP	13,8 ± 1,5	328 ± 85	42 000
	25merT^{Me}	C : dGTP	0,048 ± 0,001	17,3 ± 2,3	2800
	25merT^{Et}	C : dGTP	0,065 ± 0,018	16,4 ± 2,0	4000

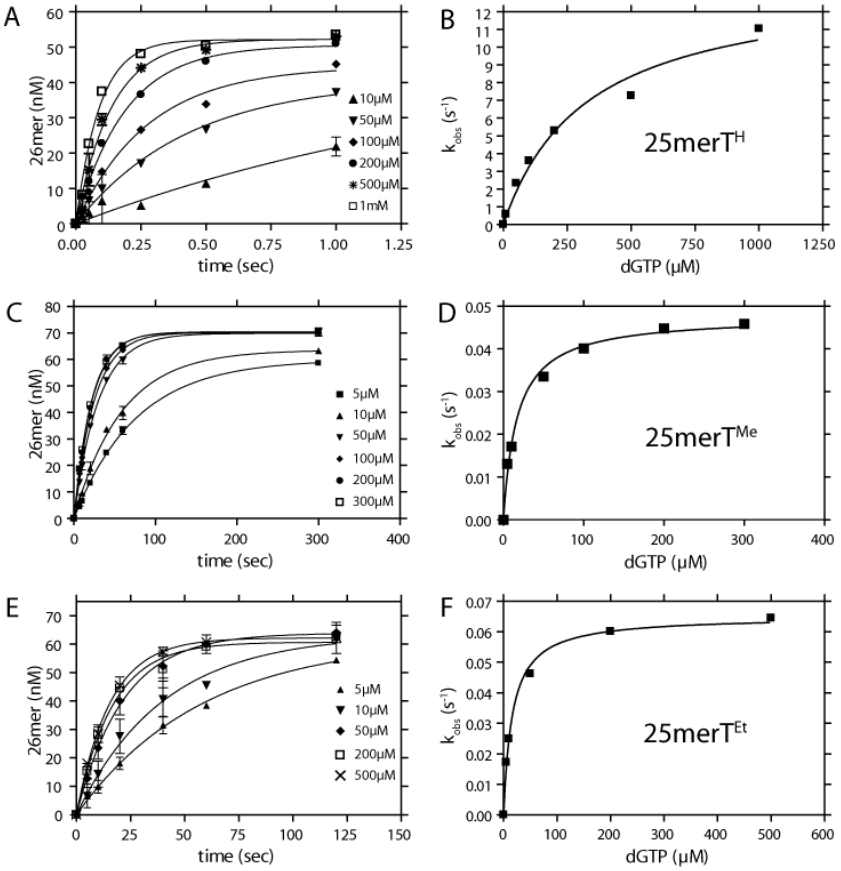


Abbildung 13: Pre-steady-state Kinetiken des Einbaus von dGTP in ein 25merT^{R}/36mer Primer/Templat-Komplex (100nM) durch die Polβ (1µM). (A, C und E) Graphische Darstellung von Produkt gegen die Zeit. Die Kurven zeigen die nicht-lineare Regression zu einer exponentiellen Gleichung. Ein Komplex von 25merT^{H} (A), 25merT^{Me} (C) oder 25merT^{Et} (E) mit dem Templat 36mer und Polβ wurde schnell mit verschiedenen Konzentrationen an dGTP gemischt. (B, D und F) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration von dGTP. Die k_{obs}-Werte wurden gegen die dGTP-Konzentration aufgetragen und mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet.

Die Effizienz der Reaktion reduzierte sich um das 15- bzw. 10-fache, wenn die Primer

25merT^{Me} und 25merT^{Et} eingesetzt wurden. Auch wenn die Effizienz beeinträchtigt wurde, waren diese Unterschiede geringer im Vergleich zu den Effekten am eintretenden dNTP (s.o.).

2.1.4 Pre-steady-state Kinetiken für das KF(exo-)

Für den Einbau der modifizierten Triphosphate mit dem KF(exo-) waren schon die steady-state und die pre-steady-state Kinetiken beschrieben [99, 103]. Das KF(exo-) konnte eine höhere Effizienz für den Einbau im Vergleich zur Polβ zeigen. Eine Zusammenfassung der Daten aus den pre-steady-state Kinetiken von *Cramer et al.* ist in Tabelle 3 gezeigt.

Die Messung der Kinetiken für die Verlängerung des modifizierten Primers wurde bislang nur unter steady-state Bedingungen durchgeführt [119]. Um die Daten untereinander vergleichen zu können, wurden die pre-steady-state Kinetiken auch vom Verlängerungsschritt vorgenommen.

Tabelle 3: Zusammenfassung der kinetischen Parameter des Einzeleinbaus von dT^{R}TP in ein 24merA/36mer Komplex durch KF(exo-). Die Reaktionen wurden bei 25°C durchgeführt. Die Daten stammen aus Referenz [103].

dT^{R}TP

5´-GTG GTG CGA AAT TTC TGA CAG ACA-3´
3´-CAC CAC GCT TTA AAG ACT GTC TGT ACT GTC TGC GTG-5´

	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
KF(exo-)	A : T^{H}TP	230 ± 13	509± 167	7 000 000
	A : T^{Me}TP	5,7 ± 0,4	546 ± 91	130 000
	A : T^{Et}TP	3,2 ± 0,1	88,8 ± 34,7	60 000

Um mögliche Sequenz-abhängige Unterschiede zu vermeiden, wurden dieselben Sequenzkontexte benutzt, die *Summerer et al.* und *Cramer et al.* eingesetzt hatten. Die mit unmodifizierter DNA erhaltene Ergebnisse liegen im selben Bereich, wie die in der

Literatur beschriebenen Werte [155-157]. Bei der Verwendung von modifizierten Primern, die eine Methyl-Gruppe trugen, sank die Affinität zum dGTP um das 7-fache, während die Geschwindigkeit der Reaktion mehr als 1000-fach geringer wurde (Abbildung 14 und Tabelle 4). Bei der Reaktion mit dem Ethyl-substituierten Primer wurden die Affinität zum dGTP und die Inkorporationsrate um das 10- bzw. 26 000-fache geringer. Die Effizienz dieser Reaktionen sank insgesamt um 7000- und um 260 000-fach in der Gegenwart der Methyl- bzw. Ethyl-Substitution.

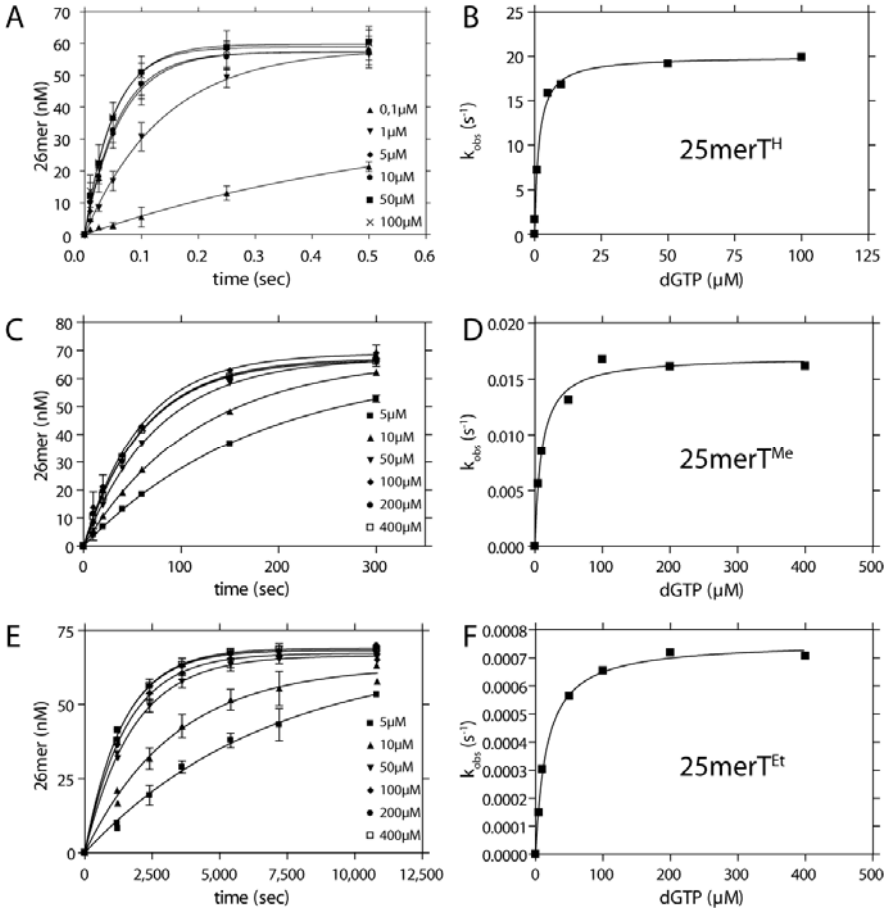


Abbildung 14: Pre-steady-state Kinetiken des Einbaus von dGTP in ein 25merT^{R}/36mer Primer/Templat-Komplex (100nM) durch KF(exo-) (200nM). (A, C und E) Graphische Darstellung von Produkt gegen die Zeit. Die Kurven zeigen die nicht-lineare Regression zu einer exponentiellen Gleichung. Ein Komplex von 25merT^{H} (A), 25merT^{Me} (C) oder 25merT^{Et} (E) mit dem Templat 36mer und KF(exo-) wurde schnell mit verschiedenen Konzentrationen an dGTP gemischt. (B, D und F) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration von dGTP. Die k_{obs}-Werte wurden gegen die dGTP-Konzentration aufgetragen und mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet.

Tabelle 4: Zusammenfassung der kinetischen Parameter des Einzeleinbaus von dGTP in ein 25merT^{R}/36mer Komplex durch das KF(exo-). [a] Die Reaktion wurde bei 22°C durchgeführt.

dGTP

5´-GTG GTG CGA AAT TTC TGA CAG ACA T^{R}-3´
3´-CAC CAC GCT TTA AAG ACT GTC TGT ACT GTC TGC GTG-5´

	Primer	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
KF(exo-)	**25merT^{H}**	C : dGTP	20,0 ± 0,3[a]	1,6 ± 0,2[a]	12 000 000[a]
	25merT^{Me}	C : dGTP	0,017 ± 0,001	10,2 ± 1,8	1700
	25merT^{Et}	C : dGTP	0,00076 ± 0,00002	16,7 ± 1,8	45

In Abbildung 15 ist der Vergleich der Effizienz der beobachteten Reaktionen aufgetragen. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Reaktion mit Polβ weniger effizient als die mit dem KF(exo-) ist, falls das eintretende dNTP an der 4´C-Position eine Alkylgruppe trägt. Das Gegenteil resultiert, wenn diese Alkylgruppe am 3´-Primerterminus vorhanden ist.

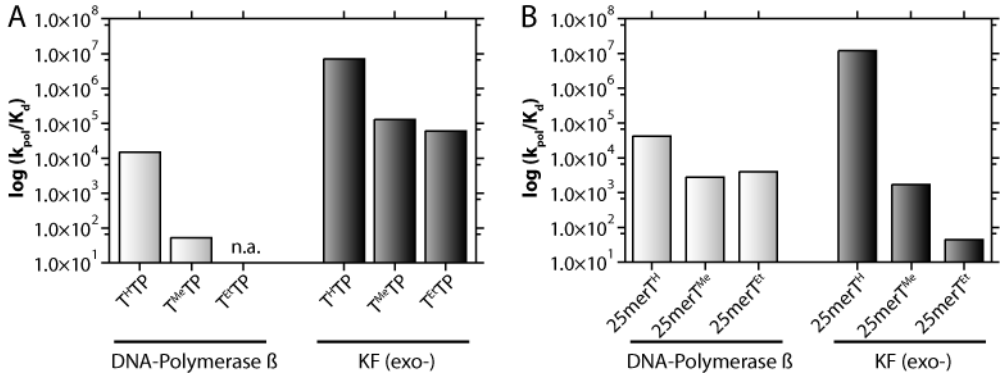


Abbildung 15: (A) Graphische Darstellung der Inkorporationseffizienz von dT^{R}TP in das 24merA/36mer Primer/Templat-Komplex durch die Polβ und das KF(exo-). (B) Graphische Darstellung der Inkorporationseffizienz von dGTP in das 4´C-alkylierte 25merT^{R}/36mer Primer/Templat-Komplex durch die Polβ und das KF(exo-).

2.1.5 Diskussion

Die kinetischen Untersuchungen der Polβ und des KF(exo-) zeigen deutlich unterschiedliche sterische Einschränkungen, die beim Zucker-Rückgrat des eingehenden Nukleotides und des 3'-Primerterminus wirken. In allen Fällen wurden die Geschwindigkeiten der Reaktionen mehr beeinträchtigt, als die Bindungsaffinität des eintretenden Nukleotid. Das bedeutet, dass die Schritte, die zur Nukleotidinkorporation führen, (wie z.B. Konformationsänderungen und die Entstehung der Phosphorsäurediester-Bindung), durch die Vergrößerung durch die Alkylgruppe mehr betroffen sind als die anfängliche Bindung des Nukleotides. Interessant zu beobachten ist, dass die beiden untersuchten Enzyme ein entgegengesetztes Verhalten zeigen, wenn sie die eingesetzten sterischen Sonden prozessieren (Abbildung 15).

Wenn auch beide Enzyme durch die Modifikation am eintretenden Nukleotid beeinträchtigt wurden, zeigte die Polβ einen stärkeren Effekt als das KF(exo-). Deutlich wird dies besonders, wenn eine weitere Vergrößerung der Modifikation an der 4´C-Position des einkommenden Nukleotid-Triphosphat von Methyl zu Ethyl vorgenommen wird. Dies verursachte nur eine weitere 2-fache Abnahme der Inkorporationseffizienz für das KF (exo-). Unter den gewählten Bedingungen war die Polβ nicht mehr in der Lage, das modifizierte Nukleotid einzubauen (Abbildung 15). Daraus kann man schließen, dass die untersuchten Enzyme verschiedene sterische Zwänge haben. Abbildung 16 zeigt die Analyse der Kristallstrukturen der Polβ und der *Bacillus stearothermophilus* DNA-Polymerase I (Bst Pol), die sehr homolog zum Klenow Fragment ist [20, 38, 40, 45, 49, 158, 159]. Gezeigt ist, dass die Desoxyribose des eintretenden dNTP komplett in der Bindungstasche eingeschlossen ist.

Die Struktur der Bst Pol zeigt enge Kontakte zwischen dem Zucker des eintretenden dNTP und verschiedenen Aminosäuren, nämlich Arg615, Ile657, Glu658 und Asp830 (für KF(exo-): Arg668, Ile709, Glu710 und Asp830). Arg668 und Glu710 wurden schon durch Mutationen ersetzt, was die Genauigkeit dieses Enzyms beeinträchtigte [160]. Bei der Polβ befinden sich zwei Aminosäuren, nämlich Tyr271 und Phe272, in

der unmittelbaren Nähe des Zuckers des eintretendes dNTPs. Diese Aminosäuren, die sich in der α-Helix M befinden, sind vermutlich in einen Teil des Diskriminierungsprozesses von Fehlpaarungen involviert [7].

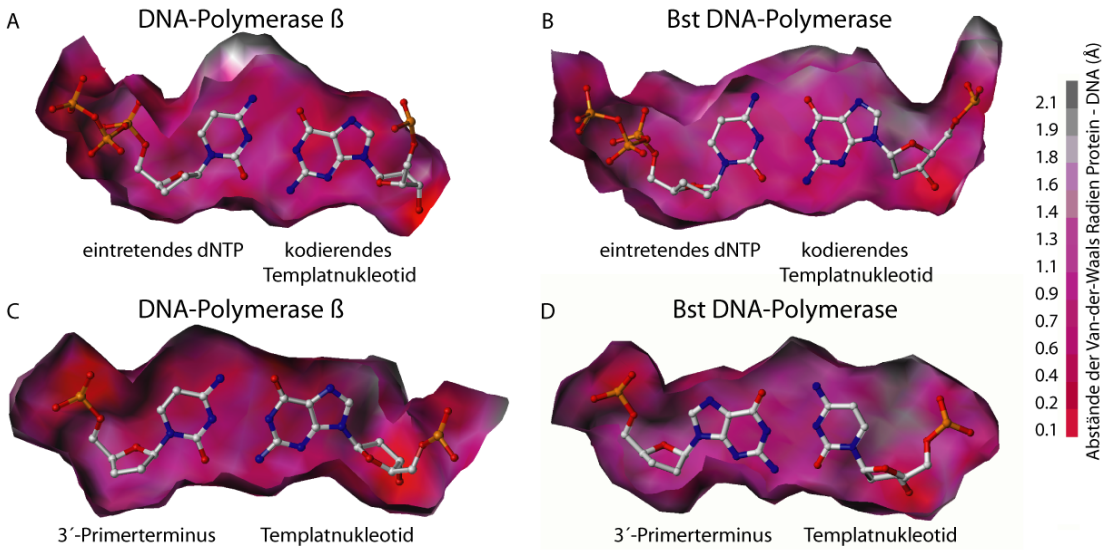


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Abstände der van-der-Waals Radien zwischen DNA und Protein für die Polβ und die Bst DNA-Polymerase. Die abgetrennten Oberflächen wurden aus den PDB-Dateien (Polβ: 1BPY und Bst: 2HVI) mithilfe von Sybyl 7.2 (Tripos) ausgerechnet. (A und B) Ansicht des entstehenden Basenpaares (eintretendes dNTP und Templatbase) für die Polβ bzw. die Bst Pol. (C und D) Ansicht des Primerterminus und komplementären Templatbase für Polβ bzw. Bst Pol. Die Farbskala ist in der Abbildung angegeben.

Die Überprüfung der Konformation des Zuckers könnte eine zusätzliche Möglichkeit sein, die Selektivität für die kanonische Basenpaarung zu erhöhen. Kristallstrukturen und Modellierungsstudien mit nicht-kanonischen Substraten konnten zeigen, dass die Konformation einiger Aminosäureseitenketten und des Nukleotides im Vergleich zur Struktur mit kanonischen Substraten verändert ist [38, 40, 93, 111, 159, 161-166]. Diese Beobachtungen tragen zur Theorie bei, dass die Veränderung einiger Seitenketten, die den Kontakt mit dem Zucker aufnehmen, zu einer veränderten Genauigkeit führen könnte. Die Zuckerkonformation würde dabei die Selektivität der DNA-Polymerase beeinflussen [7, 167-170].

Die Polβ zeigt eine ca. 10-fache geringere Genauigkeit in der Inkorporation von Nukleotiden im Vergleich zum KF(exo-) [93, 111, 166]. Nach der Theorie der "Active site tightness" wäre eine rigidere Bindungstasche beim KF(exo-) als bei der Polβ erwartet

(siehe 1.5). Die Tatsache, dass das KF(exo-) die modifizierten Nukleotide besser einbauen konnte als die Polβ, weist auf eine größere Flexibilität im aktiven Zentrum hin, zumindest in der Interaktion mit dem Zucker. Möglich ist, dass die höhere Genauigkeit des KF(exo-) durch engere Interaktionen zwischen Protein und Nukleobase verursacht wird. In der Tat wurden Experimente durchgeführt, wobei sterisch vergrößerte Nukleobasen beim KF(exo-) getestet wurden [104-109]. Diese Studien betonten die Wichtigkeit des „Fittings" der Nukleobase in der Bindungstasche, wobei sowohl die Genauigkeit als auch die Prozessivität dieses Enzyms beeinflusst wurden.

Bei der Untersuchung der Interaktionen am 3´-Primerterminus konnten Unterschiede in der Verlängerungseffizienz der alkylierten Primer festgestellt werden, die um mehrere Größenordnungen variierten. Die Vergrößerung an der 4´-C Position um eine Methyl- oder Ethyl Gruppe verursachte bei der Polβ eine 15- bzw. 10-fache Abnahme in der Verlängerungseffizienz, während beim KF(exo-) dieser Unterschied mit einem 7000- bzw. 260 000-fachen Effizienzverlust bedeutender wurde. Die NMR-Struktur der methylierten Primer wurde bestimmt, um ausschließen zu können, dass diese Unterschiede auf eine Fehlkonformation der DNA zurückzuführen waren [171]. Keine bedeutenden Unterschiede konnten festgestellt werden. Deshalb kann behauptet werden, dass die beobachteten Effekte der sterischen Vergrößerung am Primerende zuzuordnen sind.

Die Kristallstrukturen der Polβ und der Bst Pol zeigen auch in diesem Fall eine starke Interaktion zwischen Protein und Nukleotid [20, 38, 40, 49, 158, 159]. Wie in Abbildung 16 gezeigt, weiten sich die Interaktionen sowohl zur Base als auch zum Phosphat-Rückgrat aus. Aus der Struktur der Bst Pol erkennt man die Nähe der 4`-Position des Zuckers zu den Aminosäuren, die sich in der Helix von Motiv C befinden, nämlich Val828 und His829 (Val880 bzw. His881 in KF(exo-)). Diese beiden Reste sind in der direkten Umgebung vom katalytischen Asp830 (882 in KF(exo-)). Mutagenese-Studien konnten die Bedeutung dieser Reste für die Selektivität verdeutlichen [130]. Vorstellbar ist es, dass eine Störung an dieser Stelle in eine veränderte Enzymkonformation resultiert, die dann eine verringerte Effizienz in der Reaktion verursacht.

Eine andere Topologie am 3´-Primerende ist bei der Polβ zu beobachten. Die Handfläche, die das aus den Aminosäuren Arg253 -Pro261 bestehende β-Faltblatt 5 enthält, hat Kontakte mit dem Primerende in der kleinen Furche. Verantwortlich für diese Kontakte sind vor allem Arg254 und Asp256, die auch in den Nukleotidyl-Transfer involviert sind. Diese Studie konnte zeigen, dass die in der Polβ vorherrschende Enzymkonformation offensichtlich die Störung durch sterische Sonden besser tolerieren kann als die des KF(exo-). Man würde allerdings erwarten, dass die Polβ nicht-kanonische Substrate besser als das KF(exo-) prozessiert, weil sie eine geringere „Misalignment Fidelity" (d.h. Genauigkeit durch die Primeranlagerung) vorweist [111-113]. Dieser Teil der Arbeit bietet die ersten experimentellen Erkenntnisse, dass bei den untersuchten Polymerasen unterschiedliche sterische Zwänge auf den Nukleotiden am 3´-Primerterminus wirken.

Zusammenfassend, konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die Polβ und das Klenow Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I unterschiedliche sterische Zwänge sowohl am eintretenden Nukleotid, als auch am 3´-Primerterminus besitzen. Bei der Polβ sind diese Interaktionen mit dem eintretenden dNTP ausgeprägter, während das KF(exo-) mit dem 3´-Primerende stärker interagiert. Diese Erkenntnisse stimmen den experimentellen Daten über die Unterschiede in „Misalignment Fidelity" zu, wie die Prozessierung von falsch gelagerten DNA-Substraten, die Deletionen, Insertionen und letztendlich Leserasterverschiebungen verursachen können. Insgesamt, zeigen diese Ergebnisse, dass die sterischen Zwänge direkt in der Genauigkeit involviert sind.

2.2 Funktionales Screening der Polβ

2.2.1 Einleitung

Die Polβ ist die kleinste eukaryontische DNA-Polymerase, die bislang entdeckt worden ist [65]. Diese Polymerase gehört zur Familie X und ist, wie andere Mitglieder dieser Familie, involviert in der DNA-Reparatur. Sie weist eine Polymerase-Domäne (31 kDa C-Terminus) und eine DNA-Lyase-Domäne (8 kDa N-Terminus); beide diese Domänen werden in der Basenexzisionsreparatur benötigt. Diese Polymerase weist eine hohe Ähnlichkeit zur DNA-Polymerase λ, und eine niedrigere Analogie zur DNA-Polymerase μ und TdT [9].

Die Polβ in der Zelle ist beteiligt in der Basenexzisionsreparatur von einigen DNA-Schäden, wie z.B. oxidativen Läsionen oder abasischen Stellen (für Details siehe 1.3.1). Die Polβ selber besitzt jedoch keine Überlesefunktion von DNA-Schäden. Ziel dieses Teiles der Arbeit war, durch die Verwendung von gerichteter Evolution eine Mutante zu finden, die ein erhöhtes Überlesen von DNA-Schäden vorweist. Dadurch könnten Aufschlüsse über die notwendigen strukturellen und biochemischen Eigenschaften gegeben werden, die eine Bypass-Polymerase von einer Nicht-Bypass-Polymerase unterscheiden. Außerdem könnte untersucht werden, ob eine solche Polymerase mit Überlesefunktion eine Rolle in der Zelle spielen kann und eventuell vorteilhaft für das Überleben nach erhöhter DNA-Schädigung ist.

Zuerst sollte ein Screeningsystem etabliert werden, um die Aktivität der Mutanten ermitteln zu können. Dafür wurde als Startpunkt das Screening benutzt, das *Summerer* schon für die Evolution des Klenow Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I optimiert hatte [130]. Dieses System basiert auf eine Primerverlängerungsreaktion, deren Endpunkt durch einen Fluoreszenzfarbstoff detektiert wird. Die großen Vorteile dieses Systems sind die Möglichkeit, in HTS-Format zu arbeiten und dadurch, die zeitaufwendige elektrophoretische Untersuchung der Reaktionen zu vermeiden. Die erforderliche Optimierung, um dieses System für ein humanes Enzym anzupassen, wurde erfolgreich vorgenommen.

Nach den Aktivitätstests sollten die Bypass-Eigenschaften der neuen Varianten ermittelt werden. Dafür wurde ein ähnliches System benutzt, wobei entweder ein Templat mit einem DNA-Schaden in der Primerverlängerungsreaktion angewendet wurde, oder ein dNTP von der Reaktion ausgelassen wurde. Das erste System basiert auf die direkte Beobachtung von Bypass über einen Schaden, während das Zweite auf die Idee beruht, dass natürlich vorkommende Bypass-Polymerasen weniger selektiv sind [3, 96]. Wenn ein dNTP ausgelassen wird, wird die Polymerase in die Lage versetzt, beim Treffen auf die komplementäre Base im Templat entweder die Synthese zu stoppen und von der DNA zu dissoziieren oder ein Fehleinbau durchführen zu müssen. Nach dem Fehleinbau muss die Polymerase diese aberrante Konformation der DNA prozessieren und die Verlängerung an diesem Primerende durchführen. Diese veränderte DNA-Konformation wird als Nachahmung eines DNA-Schadens genutzt [172]. Diese Methode wurde schon mehrmals erfolgreich angewendet, um Varianten von DNA-Polymerasen zu finden, die ein verändertes Substratspektrum besaß [134, 168, 173].

2.2.2 Erster Ansatz

2.2.2.1 Expression aktiver humaner Polβ

Die Expression der humanen Polβ mit C-terminalem 6-Histidin-Tag wurde im pET-Expressionssystem (pET21b-Vektor) durchgeführt. Das für die hPolβ codierende Plasmid wurde von Professor Hübscher, Universität Zürich, zu Verfügung gestellt. Unter den verschiedenen getesteten *E. coli*–Stämmen erwies sich der Stamm BL21-Gold(DE3) für die Expression rekombinanter Polβ als am besten geeignet. Dieser Stamm ist besonders geeignet für die Überexpression rekombinanter Proteine, weil die OmpT- und Lon-Proteasen genetisch inaktiviert wurden. Die Bakterien wurden im mit den entsprechenden Selektionsantibiotika versetzten LB-Medium kultiviert.
Die Analyse über SDS-PAGE einer Proteinexpression ist in Abbildung 17 dargestellt. Die für die Polβ mit C-terminalem His-Tag verantwortliche Bande läuft bei ca. 40 kDa.

Das Protein war in der löslichen Phase zu finden.

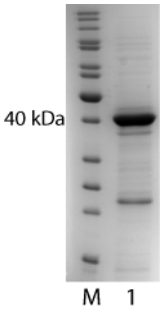


Abbildung 17: Analyse der Expression der Polβ WT in *E. coli* BL21-Gold(DE3) pET21b_hPolβ in 10-ml Kultur. SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn 1: Überstand der Expressionskultur nach 6h Induktionszeit.

2.2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese zur Erstellung einer inaktiven Variante der Polβ

Notwendig für den Erfolg der Durchmusterung einer Mutantenbibliothek sind unter anderem die Positiv- und Negativkontrollen für die Reaktion, die die ausgewählte Eigenschaft detektieren soll. Das Verhältnis zwischen Signal der Positivkontrolle und der Negativkontrolle (Hintergrund) sollte im Idealfall so groß wie möglich sein. Als Positivkontrolle für die Primerverlängerungsreaktionen wurde der Wildtyp ausgewählt. Um eine geeignete Negativkontrolle zu erhalten, wurde eine Variante der Polβ hergestellt, die eine Mutation in einem der für die Aktivität nötigen Aspartate (Asp190, Asp192 und Asp256) trägt. Asp256 wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese zu einem Alanin mutiert. Zum ersten Mal wurde die Mutante D256A 1995 von *Menge et al.* beschrieben [174]. Die katalytische Aktivität der Polβ wurde durch diese Mutation komplett aufgehoben. Die DNA-Polymerase sollte trotzdem noch in der Lage sein, das Substrat zu binden.

Die Mutagenese wurde nach den Angaben des QuikChange Kits von Stratagene durchgeführt. Dabei wird mit einem Paar komplementärer Mutation-tragender Primer die zirkuläre Plasmid-DNA in einem Thermocycler in mehreren Zyklen linear amplifiziert. Anschließend wird die parentale, methylierte Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I, welches nur *dam* methylierte DNA spaltet, abgebaut.

Schließlich wird die mutierte DNA in Bakterien transformiert, die die DNA zu einem zirkulären Plasmid ligieren. Die Sequenz der benutzten Primer ist angegeben (siehe 5.1).

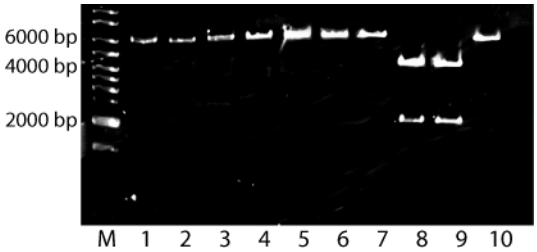


Abbildung 18: Analyse des Restriktionsverdaus einiger Plasmide nach der ortsgerichteten Mutagenese zur Einführung der Mutation D256A mittels Agarosegelelektrophorese. Ausgewählte Klone wurden gepickt und das Plasmid aus der Übernachtkultur isoliert. Nach Restriktionsverdau mit *EcoRV* wurde, im Falle einer erfolgreichen Mutagenese, eine einzelne Bande bei 6000 bp erwartet. Bahn 1-7, 10: Verdau von Plasmiden die die Mutation D256A tragen. Bahn 8 und 9: Verdau von Plasmiden die die Mutation D256A nicht tragen. M: Marker.

Das Entstehen der Mutation D256A änderte das Restriktionsmuster des Polβ-ORFs, so dass die einzige Schnittstelle für das Enzym *EcoRV* entfällt. Diese Eigenschaft des mutierten ORFs wurde genutzt, um richtige Klone zu identifizieren. Der Vektor pET21b besitzt genau eine Schnittstelle für *EcoRV*. Nach dem Verdau eines richtigen Klons wurde nur ein Fragment bei ca. 6000 bp erwartet, das dem linearisierten Plasmid entspricht. Im Falle eines Wildtyp-Klons wurden zwei Fragmente, eines bei ca. 2000 und ein anderes bei ca. 4000 bp, erwartet. Wie in Abbildung 18 dargestellt, trugen acht von zehn gepickten Klonen die richtige Mutation. Die Sequenz des kompletten ORFs eines ausgewählten Klons wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

2.2.2.3 Entwicklung eines auf Fluoreszenz basierenden Tests für das Screening

2.2.2.3.1 Aktivität der Polβ aus Lysat

Die Realisierbarkeit eines Screenings von Mutanten der Polβ basiert auf der Möglichkeit, die Enzyme im Hochdurchsatzformat erstellen zu können und die neuen Eigenschaften durch ein schnelles, reproduzierbares und zuverlässiges Testsystem zu charakterisieren. Das Ziel dieses Teiles der Arbeit war, die geeigneten Bedingungen für

die Expression und für ein Testsystem zu etablieren, bei dem zuerst die Aktivität und dann die Bypass-Eigenschaften der DNA-Polymerasen nachgewiesen werden konnten.

Zu diesem Zweck wurden erste Tests in einer radiometrischen Primerverlängerungsreaktion durchgeführt, um die Aktivität der Polβ im Lysat zu überprüfen.

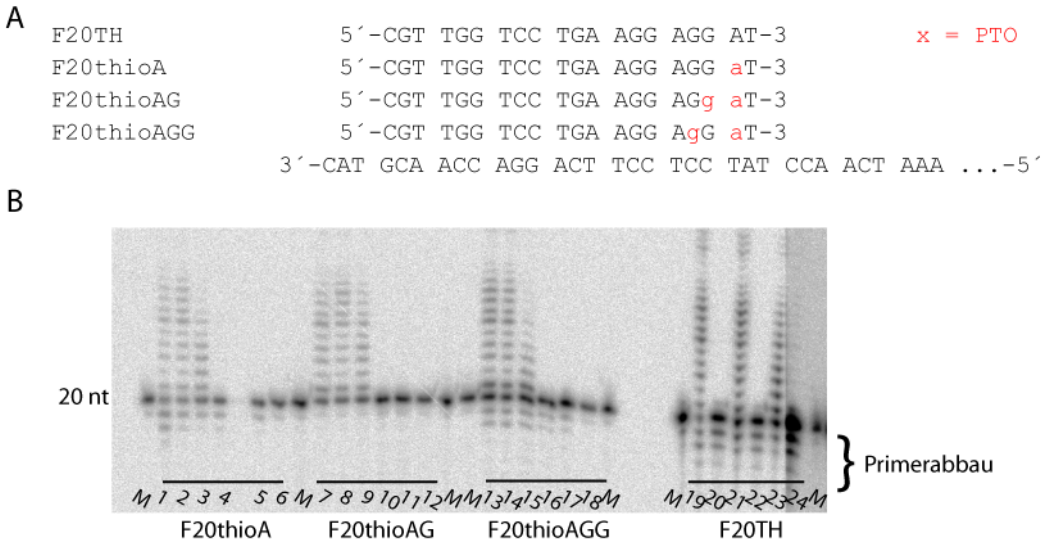


Abbildung 19: (A) Sequenzen der unmodifizierten und der PTO-modifizierten Primer. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit unmodifizierten oder PTO-modifizierten Primern. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: siehe Abbildung, Templat: F90A), 5, 2,5 oder 1µl Lysat und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 1h bei 37°C inkubiert. Die benutzten Primer sind in der Abbildung angegeben. M: Primermarker. Bahn 1-3, 7-9, 13-15: Primerverlängerungsreaktionen mit absteigenden Polβ WT-Lysatmengen. Bahn 4-6, 10-12, 16-18: Primerverlängerungsreaktionen mit absteigenden Polβ WT-Lysatmengen, ohne dNTPs. Bahn 19, 21, 23: Kontrollexperimente mit unmodifiziertem Primer und absteigenden Polβ WT-Lysatmengen. Bahn 20, 22, 24: Kontrollexperimente mit unmodifiziertem Primer und absteigenden Polβ WT-Lysatmengen, ohne dNTPs. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Für diese ersten Expressionsansätze wurden Volumina von 5 bis 20ml gewählt. Primerverlängerungsreaktionen mit radioaktiv markierten Primern wurden direkt mit den Lysaten aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) durchgeführt. Die Polymerase war aktiv, allerdings wurde eine eindeutige Endonukleaseaktivität im Lysat nachgewiesen (siehe Abbildung 19B, Primer F20TH).

Der Vergleich zwischen dem Primermarker und den Produkten der Reaktion zeigte einen starken Abbau des Primers während der Reaktionszeit. Dieser Abbau fand in

Abwesenheit von dNTPs verstärkt statt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden anschließend modifizierte Primer benutzt, die eine Phosphorothioat-Bindung (PTO) am Primerterminus enthielten. Diese Modifikation ist bekannterweise widerstandsfähiger als unmodifizierte DNA gegen Exonukleasen [175]. Drei verschiedene Kombinationen von PTOs wurden getestet (Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1 und Abbildung 19A).
Die besten Ergebnisse wurden mit dem Primer erzielt, der zwei PTO-Modifikationen zwischen den letzten zwei Nukleotiden am 3`-Ende trägt (siehe Abbildung 19B). Der Primer wurde während der Reaktionszeit nicht abgebaut und die Primerverlängerungsreaktion konnte somit erfolgen. Dieser Primer wurde für das Screening ausgewählt.

2.2.2.3.2 Expressionstests im Multilochplattenformat

Bedingung für ein Screening im Hochdurchsatzformat ist eine effiziente Expression der mutierten Proteine in einem Format, das die zeitsparende Untersuchung einer großen Anzahl an Enzymen erlaubt.

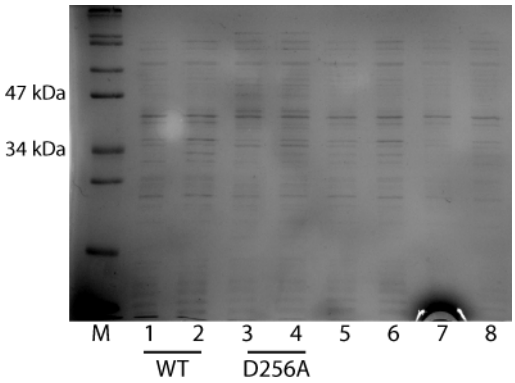


Abbildung 20: Analyse der Expression von Polβ WT und Mutanten in *E. coli* BL21-Gold(DE3) pET21b_hPolβ im 96-Well-Format. Der Überstand der Expressionskultur wurde nach 6h Induktionszeit entnommen. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn 1-2: Überstand von Polβ WT. Bahn 3-4: Überstand von Polβ D256A. Bahn 5-8: Überstand von verschiedenen Polβ Mutanten.

Für diesen Zweck wurde die Expression der Polβ in 96-Deepwellplatten getestet. Als Expressionsstamm wurde anfangs *E. coli* BL21-Gold(DE3) von Stratagene ausgewählt,

denn dieser Stamm hatte eine gute Expression im größeren Maßstab erzielt (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der Polβ in 96-Deepwellplatten erwies sich als problematisch. Verschiedene Expressionstests wurden unter variablen Temperaturen, IPTG-Konzentrationen und Induktionszeiten durchgeführt, ohne eine Verbesserung der Expression zu erzielen (als Beispiel der Proteinexpression siehe Abbildung 20).

Weitere Tests wurden mit dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL durchgeführt. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL erlaubt die Expression von Genen, die durch die seltenen Argininkodons AGA und CGA, das Isoleucinkodon AUA und das Leucinkodon CUA verschlüsselt werden durch die extrachromosomale Bereitstellung der entsprechenden tRNAs. Die Expression der Polβ in 96-Deepwellplatten konnte durch diesen Bakterienstamm erfolgreich durchgeführt werden (siehe Abbildung 21).

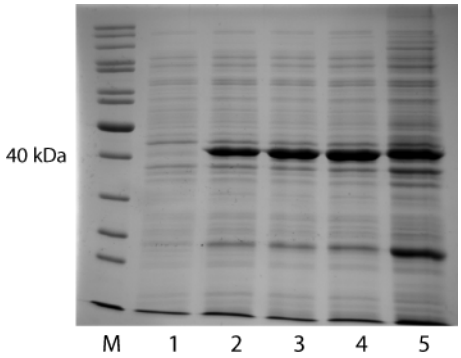


Abbildung 21: Kinetik der Expression von Polβ WT in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL pET21b_hPolβ. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn1: Überstand der Expressionskultur vor Induktion. Bahn 2-5: Überstand der Expressionskultur nach 1, 2, 4 bzw. 6h Induktionszeit.

Der Proteinmenge der Polβ erwies sich schon eine Stunde nach der Induktion als ausreichend, um Aktivitättests durchführen zu können.

Funktionale Untersuchungen mittels radiometrischer Primerverlängerungsreaktionen ergaben, dass das gereinigte Enzym aktiv war.

2.2.2.3.3 Native Lyse

Die Pellets der Expressionskulturen in 96-Deepwellplatten wurden bei -80°C gelagert. Die Lyse der Bakterien wurde auch für das Screening optimiert. Glaskugeln wurden zum mechanischen Aufschluss der Bakterien verwendet. Die Zeit der Lyse und das Volumen des Lysepuffers wurden optimiert. Nach Zugabe der Glaskugeln zum Lysepuffer wurden die 96-Deepwellplatten stark geschüttelt. Das Schütteln der Bakterienkulturen in der Gegenwart von Glaskugeln erzeugt Hitze, die zur Denaturierung des rekombinanten Proteins führen kann. Deswegen wurde die kürzeste Zeit gewählt, die eine komplette Lyse erzielen kann, die in diesem Fall fünf Minuten beträgt. Außerdem wurde die Lyse nach 2,5 Minuten für eine 10-minütige Inkubation auf Eis unterbrochen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation direkt für anschließende Experimente verwendet.

2.2.2.3.4 Aktivität der Polβ aus Lysaten (96-Deepwellplatten)

Die Lysate aus den Expressionen in 96-Deepwellplatten wurden in einer Primerverlängerungsreaktion ohne weitere Reinigungsschritte direkt eingesetzt. Als Kontrollen wurden die WT-Polymerase und die D256A-Mutante mit getestet. Wie in Abbildung 22 dargestellt, wird der Primer von jeder Mutante zu einem Vollendprodukt verlängert.

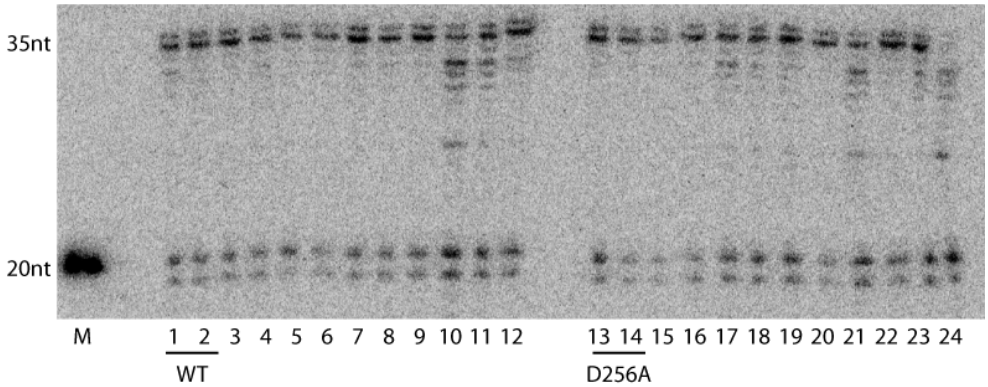


Abbildung 22: Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit verschiedenen unaufgereinigten Lysaten verschiedener Polβ-Mutanten. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat: F33A), 5µl Lysat und 200µM dNTPs. Reaktionen wurden 1h bei 37°C inkubiert. Bahn1-2: Polβ WT. Bahn 13-14: Polβ D256A. Bahn 3-12, 15-24: Polβ Mutanten. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Die Lysate der D256A-Mutante konnten auch den Primer verlängern, was zeigt, dass die DNA-Polymerasen der lysierten *E. coli*-Zellen freigesetzt wurden und die Polymerisierungsreaktion durchführen konnten. Deswegen wurde es notwendig, die Lysate mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Affinitätschromatographie zu reinigen.

2.2.2.3.5 Ni-NTA Affinitätschromatographie im 96-Well-Format

Ein Reinigungssystem wurde entwickelt, um Ni-NTA Affinitätschromatographie in 96-Well-Format durchführen zu können. Die 96-Well-Ni-NTA-Platten wurden selbst angefertigt. Eine graphische Darstellung des Systems ist in Abbildung 23 gezeigt. 96-Well-Filterplatten mit einem 0,45µm-PE-Filter wurden mit Ni-NTA Sepharose befüllt. Die Expressionskulturen im 96-Well-Format wurden im Imidazol-enthaltenden Bindepuffer lysiert und der Überstand mithilfe eines Pipettierroboters in die 96-Well-Ni-NTA-Platten überführt.

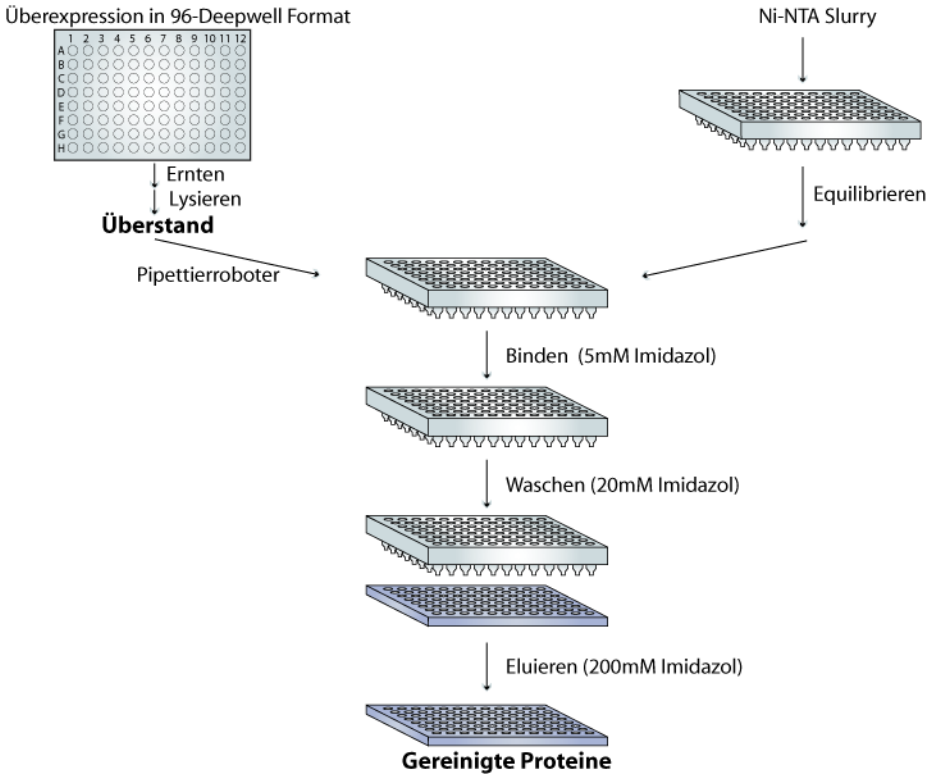


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Ni-NTA Affinitätschromatographie im 96-Well-Format. Die Expression der Proteine erfolgte in 96-Deepwellplatten. 96-Well-Filterplatten wurden mit Ni-NTA Sepharose befüllt. Nach der Lyse wurden die Überstände mittels eines automatisierten Pipettierroboters in die Ni-NTA Filterplatten überführt und die Reinigung erfolgte wie beschrieben in 3.5.3.

Ein Beispiel der Reinigung im 96-Well-Format ist in Abbildung 24 gezeigt. Zu sehen sind sowohl die Polβ WT als auch die D256A-Mutante sowie weitere Mutanten der Polβ.

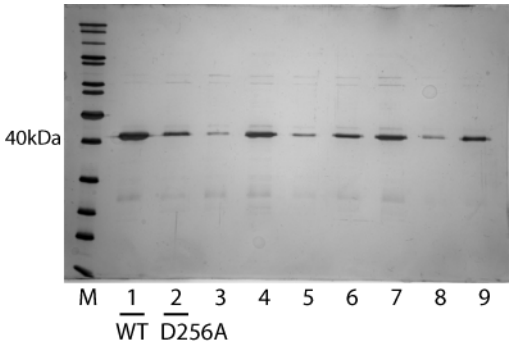


Abbildung 24: Reinigung von C-terminal 6-Histidin-markierter Polβ WT und Mutanten über Ni-NTA Affinitätschromatographie in 96-Well-Format. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen mit anschließender Silber-Färbung. M: Marker. Bahn 1: Durchfluss der Elution (200mM Imidazol) für Polβ WT. Bahn 2: Durchfluss der Elution für Polβ D256A. Bahn 3-9: Durchfluss der Elutionsschritte für verschiedene Mutanten der Polβ.

Die Konzentration der verschieden en Mutanten, die somit aufgereinigt wurden, erwies sich als sehr unterschiedlich.

2.2.2.3.6 Optimierung eines Fluoreszenz-basierten Screeningsystems

Für das Screening wurde ein Fluoreszenzsystem optimiert, das *Summerer* bereits in seiner Arbeit entwickelt hatte [176]. Es erlaubt, die Aktivität der DNA-Polymerasen schnell und in Hochdurchsatzformat zu testen. Dieses System basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffes SybrGreen I, dessen Fluoreszenz verstärkt wird, wenn er an der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA (dsDNA) bindet. Dieser Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 485nm angeregt und die Fluoreszenzemission erfolgt bei 520nm. Er konnte deshalb zur Endpunktquantifizierung der durch die Reaktion gebildeten dsDNA herangezogen werden.

In einem Ansatz wurden Primer (F20thioAG), Templat (F90A), dNTPs und Lysat in der Gegenwart von einem geeigneten Puffer gemischt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Primerverlängerungsreaktion mit einer EDTA-haltigen Lösung gestoppt, um die Mg^{2+}-Ionen zu komplexieren. DNA-Polymerasen benötigen bivalente Kationen, um den Nukleotidyltransfer zu katalysieren. Die Stopp-Lösung wurde zusätzlich mit dem Farbstoff SybrGreen I versetzt. Eine Endpunktbestimmung der in einer Reaktion entstandenen Produktmenge wurde so durchgeführt, indem die Fluoreszenz nach der Reaktion gemessen wurde (siehe Abbildung 25).

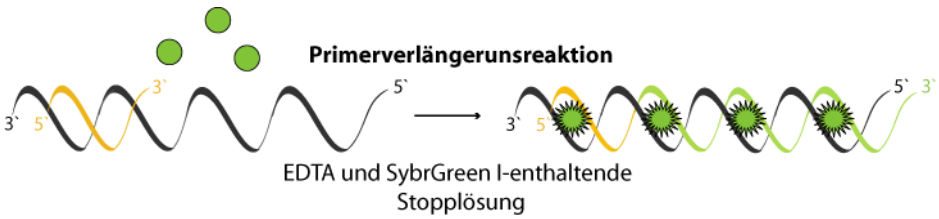


Abbildung 25: Schematische Darstellung des entwickelten Fluoreszenzsystems zur Detektion der Produktmenge nach einer Primerverlängerungsreaktion. Der Primer und die neu synthetisierte DNA sind in gelb bzw. grün abgebildet. Kreise: nicht an DNA-gebundenes SybrGreen I; Sternchen: an DNA-gebundenes SybrGreen I.

Verschiedene Optimierungen in Bezug auf die Arbeit von *Summerer* wurden herangezogen, um die besten Ergebnisse für die Polβ zu erzielen. Als Beispiel, wurden die Einflüsse von BSA im Reaktionspuffer und von NaCl in der Stopplösung untersucht (siehe Abbildung 26).

Um den Einfluss von BSA und NaCl zu testen, wurde dieselbe Reaktion in der Gegenwart und in der Abwesenheit von diesen Bestandteilen durchgeführt. Als Kontrolle wurde immer die Reaktion ohne DNA-Polymerase enthaltendes Lysat durchgeführt. Die gemessene Fluoreszenz nach den Reaktionen mit und ohne BSA wichen nicht signifikant voneinander ab. Der größte Unterschied zeigte sich bei den verschiedenen Stopplösungen. Die Gegenwart von NaCl erwies sich als störend, da dieses Salz die Emission der Fluoreszenz stark quencht.

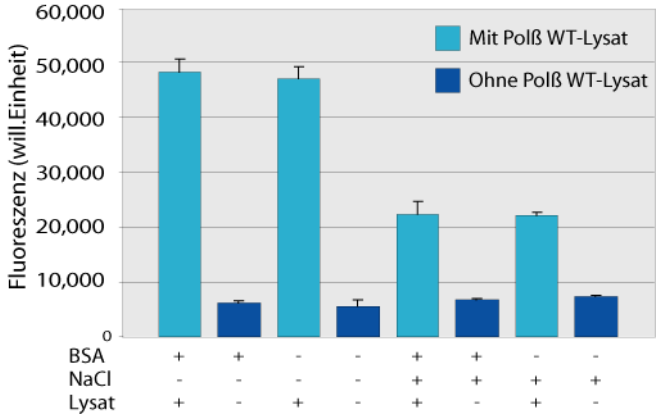


Abbildung 26: Fluoreszenzmessungen des Endpunktes nach einer Primerverlängerungsreaktion unter verschiedenen Bedingungen. Der Einfluss von BSA in dem Reaktionspuffer, sowie der von NaCl in der Stopp-Lösung, wurden getestet. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat:F90A), 5µl Lysat und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden bei 37°C 1h inkubiert und anschließend mit einer EDTA und SybrGreen I enthaltenden Stopp-Lösung angehalten. Für experimentelle Details siehe 3.6.

Außerdem wurden andere Pufferbedingungen, wie z.B. der pH-Wert, optimiert. Nach diesen Optimierungsschritten wurde ein Verhältnis Signal zu Hintergrund von 5:1 erzielt (siehe Abbildung 26). Hiermit wurden die Reaktionsbedingungen für das Screening festgelegt.

2.2.2.4 Konstruktion einer Mutantenbibliothek des Polβ-ORFs

2.2.2.4.1 Mutazyme-Bibliothek

Zur Analyse des Bypasses einer abasischen Stelle wurde eine Bibliothek der Polβ erstellt. Eine Random-Mutagenese des gesamten ORFs wurde durchgeführt. Erwünscht war ein breites Mutationsspektrum, das eine ca. 50%-ige Überlebensrate der Polymerasenaktivität erlauben konnte. Um zufällige Mutationen in dem für die Polymerase codierenden Gen zu erzeugen, wurde zunächst das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Stratagene nach Herstellerangaben benutzt. Diese Methode für die Random-Mutagenese basiert auf der fehleranfälligen Aktivität des Gemisches zweier DNA-Polymerasen, der Mutazyme I DNA-Polymerase und einer Variante der *Taq* DNA-Polymerase.

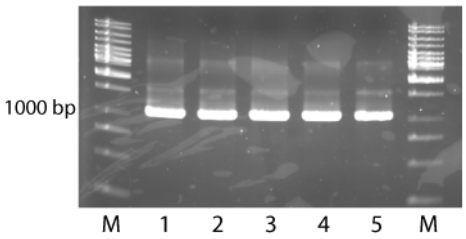


Abbildung 27: Analyse der PCR-Reaktion zur Amplifizierung des mit dem GeneMorphII-Kit erhaltenen Produktes zur Herstellung einer Plasmidbibliothek. *Pfu* DNA-Polymerase wurde verwendet. M: Marker. Bahn 1: Reaktion mit Pool1-100-Templat. Bahn 2: Reaktion mit Pool1-700-Templat. Bahn 3: Reaktion mit Pool1-1500-Templat. Bahn 4: Reaktion mit Pool1-2200-Templat. Bahn 5: Reaktion mit Pool1-3000-Templat.

Die Mutationsrate wird durch die initiale Menge der Templat-DNA und die Anzahl an PCR-Zyklen gesteuert: es wurden fünf verschiedene Templatmengen gewählt, um fünf verschiedene Bibliotheken zu erstellen. Jede Bibliothek wurde nach der Templatmenge benannt (z.B. Pool1-100 für die Templatmenge 100ng; für Details siehe 3.3.2.1). Um mehr Produkt für die Klonierung zur Verfügung zu haben, wurde ein weiterer Amplifikationsschritt mit der *Pfu* DNA-Polymerase durgeführt (siehe Abbildung 27). Nach der Amplifikation wurde das Produkt Pool1-100 mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *NotI* verdaut, in den Vektor pET21b von Novagen ligiert und in *E. coli*

XL10-Gold transformiert. Zur Kontrolle der Klonierung wurden 100µl des Transformationsansatzes ausplattiert und die restlichen 800µl in Flüssigmedium über Nacht kultiviert. Mehrere Tausende von Klonen wurden erhalten. Aus der Übernachtkultur wurde das gesamte Plasmid isoliert und zur Kontrolle der Klonierung ein Restriktionsverdau mit *EcoRV* durchgeführt. Wie in 2.2.2.2 beschrieben, besitzt das Plasmid pET21b_hPolβ zwei Erkennungssequenzen für *EcoRV*. In dem Fall einer gelungenen Klonierung wurden zwei Fragmente DNA bei ca. 2000 bp und 4000 bp erwartet. Einer misslungenen Klonierung wäre in einer Linearisierung des Plasmids vorausgegangen (siehe Abbildung 28). Bei allen fünf Bibliotheken konnte mit einer erfolgreichen Klonierung abgeschlossen werden.

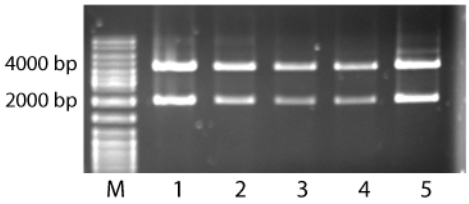


Abbildung 28: Analyse des Restriktionsverdaus von verschiedenen mutierten Plasmiden pET21b_hPolβ der Bibliothek Pool1-100 mit *EcoRV* zur Kontrolle der Klonierung. 0,8%-ige Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid Färbung. M: DNA Standard. Bahn 1-5: an Position 406 und 2452 geschnittene Plasmide.

3520 Einzelklone wurden in 384-Deepwellplatten gepickt, kultiviert und nach der Zugabe von Glycerol bei -80°C gelagert. Diese Lagerplatten wurden für das Animpfen von Expressionsplatten verwendet.

Das ORF von zehn Mutanten der Bibliothek Pool1-100 wurden sequenziert, um die Mutationsrate zu charakterisieren.

Wie man von der Tabelle 5 ablesen kann, wurden innerhalb der zehn sequenzierten Mutanten zwei Gene ohne Mutation entdeckt; eine Mutante, die eine stille Mutation trug, wurde ebenfalls isoliert, sodass letztlich drei Wildtyp-Sequenzen gefunden wurden. Als Mutationen wurden genauso häufig Tranversionen (9 Fälle) wie Transitionen (8 Fälle) entdeckt. Auch zwei Deletionen wurden gefunden. Auffällig ist die Mutation E335D, die viermal, auch in Kombination mit anderen Mutationen, vorkam.

Tabelle 5: Analyse des Mutationsspektrums der Bibliothek Pool1-100

Charakterisierung der Polβ-Mutanten von Pool1-100		
Sequenzierte Klone	10	
Wildtypsequenzen	3	30%
Klone mit Deletionen	2	20%
Klone mit Insertionen	-	
Klone mit Mutationen	7	70%
Ausgetauschte Nukleotide	17	
Transitionen	8	
Transversionen	9	
Anzahl Einfachmutanten (auf Proteinebene)	2	28,5%
Anzahl Doppelmutanten (auf Proteinebene)	3	43%
Anzahl Mehrfachmutanten (auf Proteinebene)	2	28,5%

2.2.2.4.2 Fehleranfällige PCR

Da das Mutationsspektrum der sequenzierten Mutanten keine hohe Vielfalt vorwies, wurde anschließend eine zweite Bibliothek mit einer anderen Mutagenese-Methode hergestellt.

Diese Methode basiert auf der Eigenschaft der *Taq* DNA-Polymerase, die in der Gegenwart von Mn^{2+} eine erhöhte Fehlerrate zeigt. Das beschriebene Fehlermuster dieser Methode zeigt, dass mehr Transitionen als Transversionen stattfinden [136, 177]. Um diese Fehlertendenz zu korrigieren wurden unbalancierte dNTPs-Mengen zugegeben (siehe 3.3.2.2). Die höchste $MnCl_2$-Konzentration, bei der ein PCR-Produkt entstand, wurde ausgewählt. Diese betrug 0,05mM $MnCl_2$, wonach die Bibliothek benannt wurde.

Um die Klonierung der Bibliothek zu kontrollieren wurden einige Klone gepickt und eine Kolonie-PCR durchgeführt (siehe 3.3.3). Alle neun Klone, die getestet wurden, zeigten ein DNA Fragment bei einer Größe von etwa 1000 bp (siehe Abbildung 29).

Das entspricht der erwarteten Größe des ORFs der Polβ. Somit wurde festgestellt, dass die Klonierung der Mutantenbibliothek erfolgreich war.

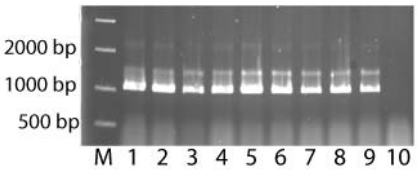


Abbildung 29: Analyse mittels Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR von der Mutantenbibliothek Pool2 zur Kontrolle der Klonierung. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurden neun Klone gepickt und das Insert (ca. 1000 bp) wurde in einer PCR direkt amplifiziert. Ein Klon aus der Platte der Negativkontrolle wurde ebenfalls getestet. Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt wie in 3.3.3 beschrieben. M: Marker. Bahn 1-9: Reaktion mit verschiedenen Klonen aus der Ligationsplatte. Bahn 10: Reaktion mit einem Klon aus der Platte der Negativkontrolle.

Das ORF von zehn Mutanten der Bibliothek Pool2 wurde sequenziert, um die Mutationsrate zu charakterisieren. Wie man von der Tabelle 6 ablesen kann, wurden innerhalb der zehn sequenzierten Mutanten keine Wildtyp-Sequenzen gefunden; zwei Mutanten wiesen Deletionen auf, die zu einem Frameshift führten. Als Mutationen wurden ähnlich viele Transitionen (14 Fälle) wie Tranversionen (19 Fälle) entdeckt.

Tabelle 6: Analyse des Mutationsspektrums der Bibliothek Pool2

Charakterisierung der Polβ-Mutanten von Pool2		
Sequenzierte Klone	10	
Wildtypsequenzen	-	
Klone mit Deletionen	2	
Klone mit Insertionen	-	
Klone mit Mutationen	10	100%
Ausgetauschte Nukleotide	33	
Transitionen	14	
Transversionen	19	
Anzahl Einfachmutanten (auf Proteinebene)	1	12,5%
Anzahl Doppelmutanten (auf Proteinebene)	4	50%
Anzahl Mehrfachmutanten (auf Proteinebene)	3	37,5%

Zwei Mutationen wurden je zweimal auch in Kombination mit anderen gefunden. Insgesamt erwies sich diese Methode als besser geeignet als das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Stratagene, um ein breites Mutationsspektrum zu erzielen.

2.2.2.4.3 Übersicht des Screeningsystems

Eine Zusammenfassung des festgelegten Screeningsystems ist in Abbildung 30 gezeigt. Die Mutantenbibliothek-DNA wurde in *E. coli* transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Einzelkolonien wurden gepickt und in 384-Deepwellplatten kultiviert. Diese Flüssigkulturen wurden mit Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert. Diese dienten als Lagerplatten, die später für die Expression eingesetzt werden konnten. Mittels Pipettierroboter wurden diese Glycerolstocks in 96-Deepwellplatten überimpft und die Überexpression der Protein wurde durchgeführt. Die pelletierten Bakterien wurden bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden die Bakterien lysiert und eine Ni-NTA Reinigung durchgeführt. Die Eluate wurden schließlich in einer Primerverlängerungsreaktion in 384-Well Format eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit einer SybrGreen I-enthaltenden Lösung gestoppt und die Fluoreszenz wurde in einem Plattenlesegerät gemessen. Auf jeder 384-Wellplatte wurden immer sechzehn Wildtypen und sechzehn katalytisch-inaktive Mutanten als Kontrolle mit getestet.

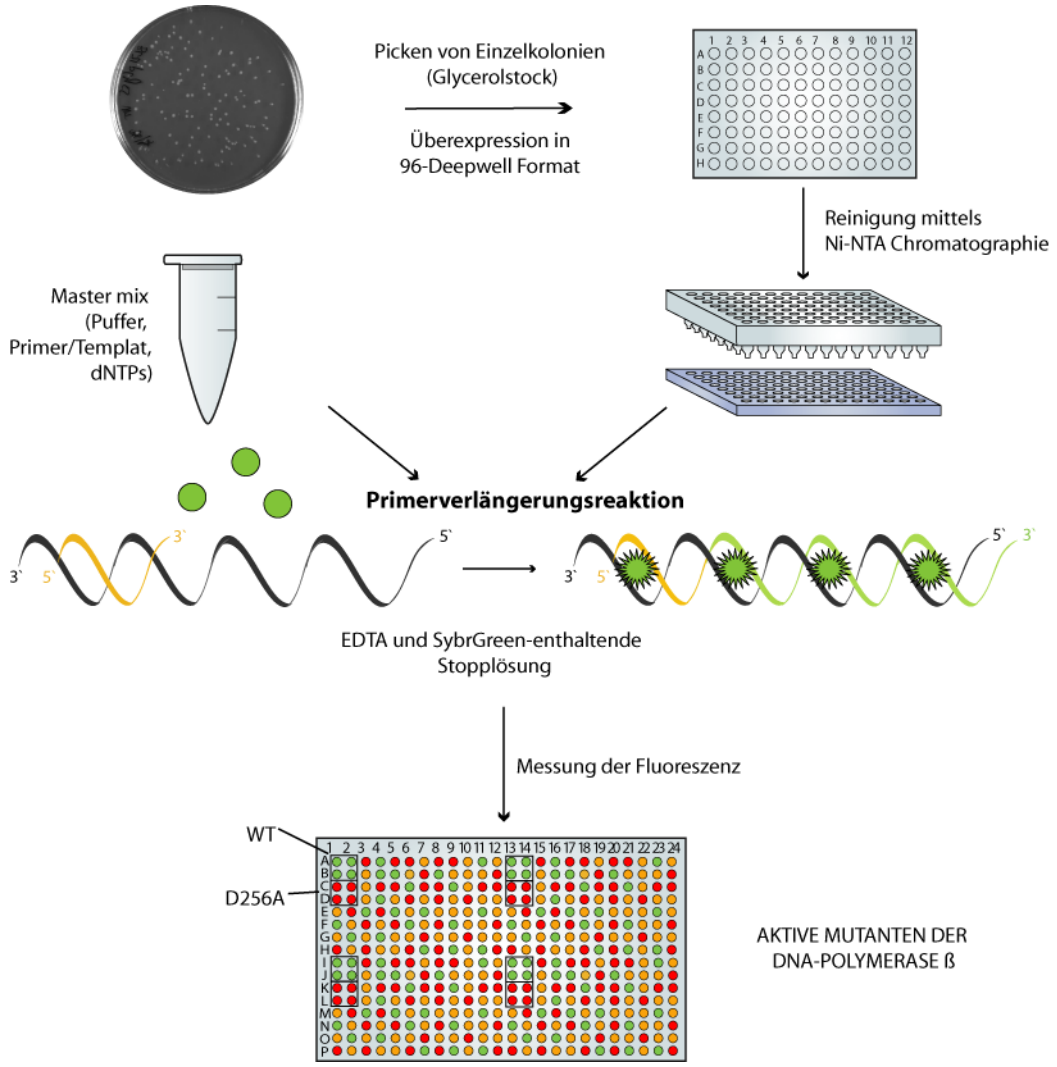


Abbildung 30: Graphische Darstellung der benutzten Mutanten-Screening Methode. Kolonien, die für mutierte Varianten der Polβ codierenden Plasmide trugen, wurden einzeln gepickt und in Hochdurchsatzplatten kultiviert. Nach Reinigung der Mutanten wurde ein Aktivitätstest durchgeführt.

2.2.2.4.4 Evaluierung des Screeningsystems

Als Kontrolle der in 96-Well-Format aufgereinigten Enzyme und um das Screeningsystem zu testen, wurde die Primerverlängerungsreaktion gleichzeitig sowohl radiometrisch als auch mit dem SybrGreen I-System durchgeführt. Dieselben Reaktionsbedingungen und Enzymmengen wurden für beide Reaktionen benutzt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 31 gezeigt.

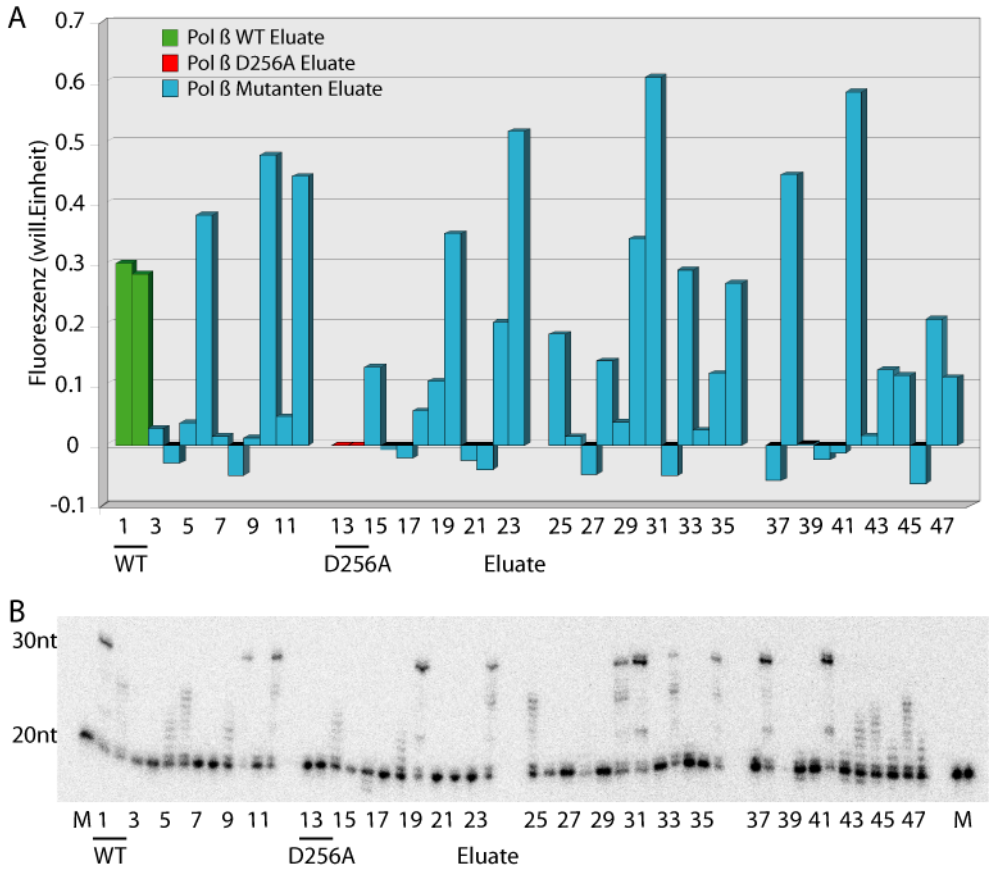


Abbildung 31: (A) Endpunktmessung der SybrGreen I– vermittelten Fluoreszenz von dsDNA zur Aktivitätsmessung von Polβ-Aktivität. Zu einer Lösung von unmodifizierten Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F90A) und 200µM dNTP in Reaktionspuffer wurden 5µl des Ni-NTA aufgereinigten Enzym gegeben und die Reaktionsmischung 1h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt und die gebildete Menge dsDNA mittels SybrGreen I-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 520nm quantifiziert. Reaktionen durchgeführt mit hPolβ WT-Lysaten bzw. hPolβ D256A-Lysaten sind in der Abbildung gekennzeichnet. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit denselben Polβ-Eluaten wie in (A) zur Kontrolle des Fluoreszenz-basierten Screeningtests. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F33A), 5µl Eluat, 200µM dNTPs. Reaktionen wurden 1h bei 37°C inkubiert. M: Primermarker. Bahn 1-2: Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ WT-Eluaten. Bahn 13-14: Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ D256A-Eluaten. Bahn 3-12, 15-48: Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ Mutanten-Eluaten. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

In der SybrGreen I Reaktion betrug das Verhältnis zwischen Signal des Wildtyps zum Signal der D256A-Mutante ca. 2:1. Die verschiedenen Mutanten, die getestet wurden, zeigten eine Aktivität zwischen 50% und 150% des Wildtyps.

In der radiometrischen Reaktion wurde bestätigt, dass die Verlängerung der Primer von dem WT-Enzym bis zum Vollendprodukt durchgeführt wurde, während die D256A-Mutante den Primer nicht verlängern konnte. Die verschiedenen Mutanten, die getestet

wurden, zeigten unterschiedliche Aktivitäten, genauso wie in der SybrGreen I Reaktion nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Primerverlängerungsreaktion mit SybrGreen I zuverlässig in der Ermittlung der Aktivität der verschiedenen DNA-Polymerasen war. Dieser Test war demnach geeignet, um ein Screening von einer Mutantenbibliothek durchführen zu können.

2.2.2.5 Identifizierung der Polβ-Mutanten mit erhöhter Bypass-Aktivität einer abasischen Stelle durch funktionales Screening

Die Pool2 Bibliothek wurde zunächst auf Aktivität bei der Primerverlängerung in der Gegenwart von einem unmodifizierten Templat (F90A) mit Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} gescreent (für Details der Reaktion siehe 3.6.2). Mn^{2+} wurde benutzt, um die Aktivität der DNA-Polymerase zu erhöhen [39, 174]. Nachteil dieser Methode war, dass die Polβ in der Gegenwart von Mn^{2+} ungenauer wird. Deswegen wurde in der Bypass-Reaktion Mn^{2+} durch Mg^{2+} ersetzt.

Zehn 384-Deepwellplatten wurden gepickt und die Aktivitätstests wurden durchgeführt wie in 2.2.2.3 beschrieben.

Insgesamt wurden 3520 verschiedene Mutanten auf ihre Aktivität getestet. Davon konnten weniger als 50% (1302) der Mutanten noch eine Verlängerung eines Primers unter den gewählten Bedingungen zeigen. Nur die Mutanten, die noch Aktivität bewiesen, wurden schließlich auf Bypass-Aktivität einer abasischen Stelle getestet. Als Templat für die Bypass-Experimente wurde ein Oligonukleotid verwendet, das dieselbe DNA-Sequenz vom F90A besaß, mit dem Unterschied, dass sich eine abasische Stelle drei Basen vor dem 3`-Ende der Primer befand (F90Ap; Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1). Die natürlich vorkommende abasische Stelle wurde wegen Stabilitätsprobleme durch eine ähnliche Struktur, das Tetrahydrofuran, ersetzt, die sogenannte „stabile abasische Stelle“ (Abbildung 32) [178]. Die natürlich vorkommende Struktur weist eine Hydroxylgruppe an Position 1 des Zuckers auf, die aber zu einem DNA-Strangbruch führen kann.

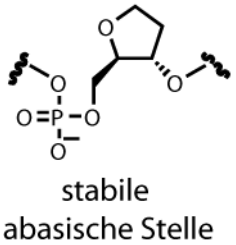


Abbildung 32: Struktur einer stabilen abasischen Stelle

Die Primerverlängerung in der Gegenwart von dem modifizierten Templat wurde mit der Reaktion, die in Gegenwart des unmodifizierten Templats durchgeführt wurde, verglichen. Auf derselben 384-Well- Mikrotiterplatte wurden parallel diese zwei Reaktionen durchgeführt, um die Fluoreszenzmessung nach Zugabe von SybrGreen I direkt vergleichen zu können.

In Abbildung 33 wird die Auswertung von 96 Primerverlängerungsreaktionen auf einer 384-Well-Mikrotiterplatte gezeigt. Die Reaktionen wurden jeweils in der Gegenwart von einem unmodifizierten (F90A) und einem modifizierten (F90Ap) Templat durchgeführt. Die zurückgestellten dunkelblauen Balken zeigen die Fluoreszenz eines Wells, in dem die Reaktion mit dem unmodifizierten Templat stattfand, während die Hellblauen im Vordergrund stehenden Balken die Fluoreszenz der Wells zeigen, in dem die Reaktion mit dem gleichen Enzym aber in der Gegenwart des modifizierten Templats stattfand.

Vier Reaktionen aus 96 Klonen wurden jeweils mit dem Wildtyp- und dem D256A-Enzym durchgeführt (siehe Beschriftung in der Abbildung 33). Beim Wildtyp war die gemessene Fluoreszenz bei der Reaktion mit dem unmodifizierten Templat ungefähr zweimal so stark wie die mit dem modifizierten Templat. Die D256A-Mutante zeigte ähnliche Fluoreszenzwerte für beide Reaktionen. Die meisten Mutanten zeigten eine Primerverlängerung bei dem Templat F90A aber keine oder eine Unvollständige in dem Falle des Templats F90Ap, genauso wie beim Wildtyp-Enzym. Nur eine Mutante wies eine Fluoreszenz bei dem Templat F90Ap auf, die vergleichbar zu den Werten beim Templat F90A vom Wildtyp-Enzym war. Diese Mutante wurde 2N7 genannt (Platte 2, Loch N7).

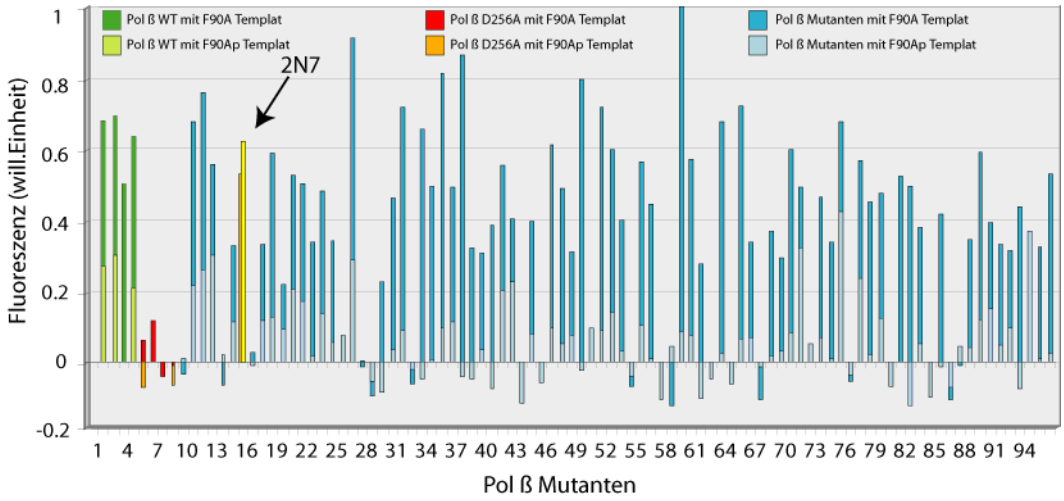


Abbildung 33: Endpunktmessung der SybrGreen I – vermittelten Fluoreszenz von dsDNA zur Bypassaktivitätsmessung von hPolβ Lysaten aus *E. coli*. Zu einer Lösung von Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F90A, dunkle Balken oder F90Ap, helle Balken) und 200µM dNTPs in Reaktionspuffer wurde Lysat von expressionsinduzierten *E. coli* gegeben, die einen für hPolβ WT, hPolβ D256A oder zufällige Mutanten kodierenden Vektor enthielten und die Reaktionsmischung wurde 1h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt und die gebildete Menge dsDNA mittels SybrGreen I-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 520nm quantifiziert. Die Fluoreszenz wurde ermittelt mittels Plattenreader. Die Fluoreszenzwerte sind korrigiert für den Wert der negativen Kontrolle und normalisiert zum Höchstwert.

2.2.2.6 Reinigung und Charakterisierung der Mutante 2N7

Die 2N7-Mutante wurde aufgereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Als Kontrolle wurde das Wildtyp-Enzym in jedem Schritt genauso behandelt. Die Polβ ließ sich mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie reinigen [126].

Beide rekombinanten Proteine wurden als Fusionskonstrukt mit einem C-terminalen His-Tag hergestellt. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der Reinigung, sowohl für die Polymerase β WT, als auch für die Mutante 2N7 (für Detail siehe3.5.1 3.5).

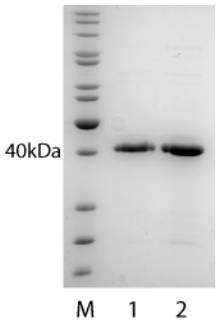


Abbildung 34: C-terminal 6-Histidin-getaggter Polβ WT und Mutante 2N7 nach Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn 1: Polβ WT. Bahn 2: Polβ 2N7.

Weitere Tests wurden mittels radiometrischer Primerverlängerungsreaktion durchgeführt. Wie in Abbildung 35 gezeigt, wies die 2N7-Mutante eine höhere Bypass-Aktivität über eine abasische Stelle auf. Das Wildtyp-Enzym konnte eine Base gegenüber von der abasischen Stelle einfügen, aber die Verlängerung dieser gepaarten Base konnte kaum weitergeführt werden, auch wenn die Konzentration des Enzyms verdoppelt wurde. Die 2N7-Mutante hatte eine etwa doppelt so hohe Bypass-Aktivität als das Wildtyp-Enzym.

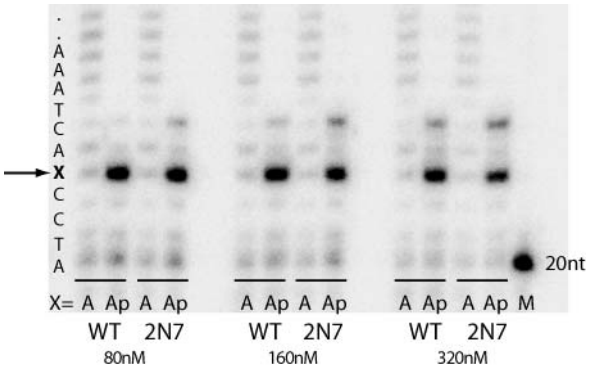


Abbildung 35: Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen zur Charakterisierung des Bypasses einer abasischen Stelle. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F90Ap) und 200µM dNTPs. Das Enzym und die entsprechende Menge sind in der Abbildung angegeben.

Die für diese Mutante codierende-DNA wurde sequenziert (GATC Biotech). Diese Variante der Polβ trug eine einzelne Mutation, bei der Valin an Position 269 zu Isoleucin ausgetauscht war (V269I).

Da die Bypass-Eigenschaften dieser Mutante nicht so ausgeprägt waren, wurde keine

genauere Charakterisierung vorgenommen und eine weitere Runde Evolution wurde direkt durchgeführt. Das Gen der 2N7-Mutante wurde als Templat für eine neue randomisierte Mutagenese benutzt, erneut wurde eine Mutantenbibliothek konstruiert und gescreent (2.2.2.5). Die Mutationen wurden durch eine fehleranfällige PCR erhalten (3.3.2.2). Ca. 4000 Mutanten wurden somit durchmustert.
Aus diesem Screening konnte jedoch keine Variante der Polβ mit verbesserten Eigenschaften im Bezug auf die 2N7-Variante isoliert werden (Daten nicht gezeigt).
Da es nur eine Variante der Polβ mit verbesserten Überlesefunktion isoliert werden konnte, die aber nicht weiter verbessert werden konnte, wurde ein neuer Ansatz gesucht. Das Vorgehen mit der Ni-NTA Reinigung auf 96-Well Format sollte aufgegeben werden, weil diese zu arbeitsintensiv ist und dadurch keine größere Mutantenbibliothek gescreent werden konnte. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben, wie eine neue Strategie erfolgreich entwickelt wurde.

2.2.3 Entwicklung eines neuen Screeningsystems mithilfe eines Kodon-optimierten Gens der Polβ

Durch die Erfahrung der ersten Mutantenbibliothek wurde klar, dass ein wichtiger Erfolgsfaktor für das Isolieren von Mutanten mit neuen Eigenschaften der hohe Durchsatz des Screening ist. Deswegen wurde das Konzept der Ni-NTA Reinigung im 96-Well-Format verlassen, und erneut versucht, mit Bakterienextrakten zu arbeiten. Dafür wurde eine „Kodon-optimierte“ Version des Polβ-Gens bei der Firma Geneart bestellt, das eine verbesserte Expression des Proteins in *E. coli* erzielen sollte. Das für die Polβ-codierende Gen wurde an den Kodon-Gebrauch der *E. coli* angepasst. Zusätzlich wurde einerseits eine erhöhte Stabilität der RNA erzielt und ebenfalls wurden interne Ribosom-Bindestellen entfernt. Das Gen wurde komplett chemisch synthetisiert und anschließend in ein Plasmid kloniert. Das Insert wurde in den Vektor pET21b (Novagen) durch die Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* umkloniert. Da während des Screenings der ersten Bibliothek die Beobachtung gemacht worden war, dass der

pET21b-Vektor keine stringente Kontrolle der Expression vorwies, wurde das Gen auch in den Vektor pGDR11 durch die Restriktionsenzyme *SalI* und *BamHI* umkloniert. Dieser Vektor ist ein Derivat des pQE-31-Vektor (Qiagen), der eine Kopie des Lac_{Iq}-Gens enthält und deswegen eine sehr stringente Kontrolle der Expression ermöglicht.

2.2.3.1 Expression und Lyse mit dem Kodon-optimierten Gen

Erste Expressionstests wurden in einem Volumen von 50ml durchgeführt. Das Ziel dieser Tests war der direkte Vergleich der Expression des rekombinanten Proteins bedingt durch das originale und das Kodon-optimierte Gen. *E. coli* BL21-Gold(DE3) wurden jeweils mit dem für die Polβ codierenden originalen Plasmid (pET21b_hPolβ) oder mit dem Kodon-optimierten Plasmid (pET21b_hPolβ_codon_optimized) transformiert. Die Testexpressionen erfolgten gleichzeitig und unter denselben Bedingungen.

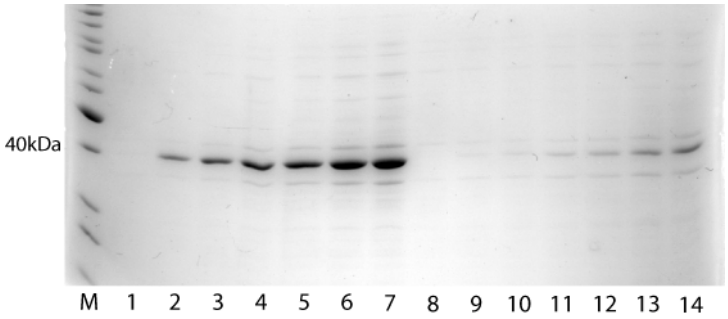


Abbildung 36: Vergleich der Expression im 50-ml Volumen der Polβ WT in *E. coli* BL21-Gold(DE3) bedingt durch die originale oder die Kodon-optimierte DNA Sequenz. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn1-3: Überstand der Expressionskultur aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) pET21b_hPolβ_codon_optimized vor Induktion oder nach 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 bzw. 7h Induktionszeit. Bahn 8-14: Überstand der Expressionskultur aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) pET21b_hPolβ vor Induktion oder nach 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 bzw. 7h Induktionszeit.

Die Überexpression des Proteins wurde für beide Kulturen bei einer OD_{600} von 0,6-0,7 mit IPTG induziert. Proben nach verschiedenen Zeiten wurden entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 36). Die Überexpression bedingt durch das Kodon-optimierte Gen konnte schon nach 1,5h Induktionszeit nachgewiesen werden, während die Expression bedingt durch das originale Gen erst nach 4,5h nachweisbar

war. Nicht nur die Expressionskinetik sondern auch die Menge an exprimiertes Protein wurde verbessert. In der Tat betrug die Menge an Polβ mehr als 50% des gesamten *E. coli*-Proteingehaltes. Somit konnte die verbesserte Expression in *E. coli* bestätigt werden.

Entscheidend für das Gelingen eines HTS-Screenings war allerdings die Expression in 96-Deepwellplatten. Für diesen Zweck wurde die Expression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen sowohl mit dem Konstrukt pET21b- als auch mit dem pGDR11-Vektor getestet. Verschiedene Expressionsstämme und verschiedene Bedingungen (wie IPTG-Konzentration und Expressionszeiten) wurden ausprobiert. Beispiel für die Unterschiede bedingt durch den *E. coli*-Stamm ist in Abbildung 37 gezeigt. Die Expression der Polβ in 96-Deepwellplatten in *E. coli* XL10-Gold war eindeutig höher im Vergleich zur Expression in den BL21-Gold(DE3).

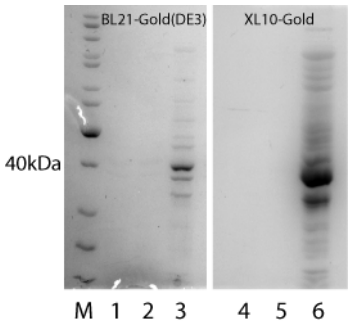


Abbildung 37: Kinetik der Expression in 96-Deepwellplatten von Polβ WT in *E. coli* BL21-Gold(DE3) und in XL10-Gold. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn1-3: Überstand der Expressionskultur aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) pGDR11_hPolβ_codon_optimized vor Induktion oder nach 2 bzw. 6h Induktionszeit. Bahn 4-6: Überstand der Expressionskultur aus *E. coli* XL10-Gold pGDR11_hPolβ_codon_optimized vor Induktion oder nach 2 bzw. 6h Induktionszeit.

Das Expressionssystem in *E. coli* XL10-Gold basierend auf dem pGDR11_hPolβ_codon_optimized-Vektor wurde für das Screening ausgewählt.

Die Lyse der Bakterien wurde erneut für das Screening optimiert. Eine geringe Konzentration an Lysozym (0,1mg/ml) wurde verwendet, um die Bakterien aufzuschließen. Ein Lysepuffer wurde dafür optimiert. Nach 45-minütiger Behandlung auf Eis wurde die dreifache Menge an einem Lagerpuffer zugegeben (für die

Pufferzusammensetzung siehe 4.6). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation direkt für anschließende Experimente verwendet.

2.2.3.2 Konstruktion der Bibliothek Pool3

Da das Mutationsspektrum der vorherigen Bibliothek eine hohe Vielfältigkeit vorwies, wurde anschließend die neue Bibliothek erneut mit der ep-PCR Mutagenese-Methode hergestellt.

Verschiedene Ansätze mit steigender $MnCl_2$-Konzentration (zwischen 0 und 0,3mM) wurden getestet, wobei bei allen Bedingungen ein PCR-Produkt entstand (siehe Abbildung 38). Von diesen Ansätzen wurden drei ausgewählt und mithilfe der Restriktionsenzymen *BamHI* und *SalI* in den pGDR11-Vektor kloniert (siehe 3.3.5).

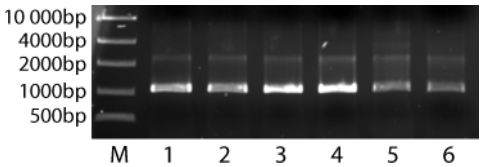


Abbildung 38: Analyse mittels Agarosegelelektrophorese der ep-PCR zur fehlerhaften Amplifikation des ORFs im Vektor pGDR11_Polβ. Ein Gradient der $MnCl_2$-Konzentration wurde gefahren. Die ep-PCR wurde durchgeführt wie in 3.3.3 beschrieben. M: Marker. Bahn 1-6: Reaktion mit verschiedenen $MnCl_2$-Konzentrationen: 0mM; 0,025mM; 0,05mM; 0,1mM; 0,2mM; 0,3mM.

Einige Klone aus jeder Bibliothek wurden gepickt und auf Aktivität getestet. Wie erwartet, erwies sich die Anzahl der aktiven Mutanten als umgekehrt proportional zur in der in der ep-PCR benutzten $MnCl_2$-Konzentration. Die Bibliothek wurde ausgewählt, bei der ca. 50% der Mutanten Aktivität aufwiesen. Dies war bei einer $MnCl_2$-Konzentration von 0,1mM der Fall.

Wie schon in 2.2.2.4.2 beschrieben, wurden zehn Klone gepickt und eine Kolonie-PCR durchgeführt, um die Klonierung der Bibliothek zu kontrollieren. Alle getesteten Klone zeigten ein DNA Fragment bei einer Größe von etwa 1000 bp.

Das Mutationsspektrum wurde wie für die vorherigen Bibliotheken analysiert. Die

Ergebnisse aus den Sequenzierungen von 10 Klonen ist in Tabelle 7 aufgeführt. Innerhalb der sequenzierten Klone wurde keine Wildtyp-Sequenz gefunden. Die Anzahl der Transversionen gegenüber den Transitionen war wieder ausgeglichen. Keine Deletionen oder Insertionen hatten stattgefunden, sodass kein Frameshift erfolgte. Die Wiederholung einer einzigen Mutation wurde in zwei verschiedenen Mutanten beobachtet.

Tabelle 7: Analyse des Mutationsspektrums der Bibliothek Pool3

Charakterisierung der Polβ-Mutanten von Pool3		
Sequenzierte Klone	10	
Wildtypsequenzen	-	
Klone mit Deletionen	-	
Klone mit Insertionen	-	
Klone mit Mutationen	10	100%
Ausgetauschte Nukleotide	25	
Transitionen	14	
Transversionen	11	
Anzahl Einfachmutanten (auf Proteinebene)	4	40%
Anzahl Doppelmutanten (auf Proteinebene)	2	20%
Anzahl Mehrfachmutanten (auf Proteinebene)	4	40%

2.2.3.3 Übersicht des Systems

Abbildung 39 zeigt die Zusammenfassung des Screenings, das für Lysate aus *E. coli* optimiert worden ist. Wie schon für die erste Bibliothek wurde die Mutantenbibliothek-DNA in *E. coli* transformiert und ausplattiert. Einzelkolonien wurden gepickt und in 384-Deepwellplatten kultiviert. Die Glycerolstocks wurden mithilfe eines Pipettierroboters in 96-Deepwellplatten überimpft und die Überexpression der Protein wurde durchgeführt. Die pelletierten Bakterien wurden bei -80°C gelagert. Der größte

Unterschied zu dem vorherigen System besteht in der Möglichkeit, die Extrakte aus *E. coli* direkt in einer Primerverlängerungsreaktion einsetzen zu können. Die Reaktionen wurden mit einer SybrGreen I-enthaltende Lösung gestoppt und die Fluoreszenz wurde in einem Plattenlesegerät gemessen. Auf jeder Platten wurden immer sechszehn Wildtypen und sechszehn katalytisch-inaktiven Mutanten als Kontrolle eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in 384-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt.

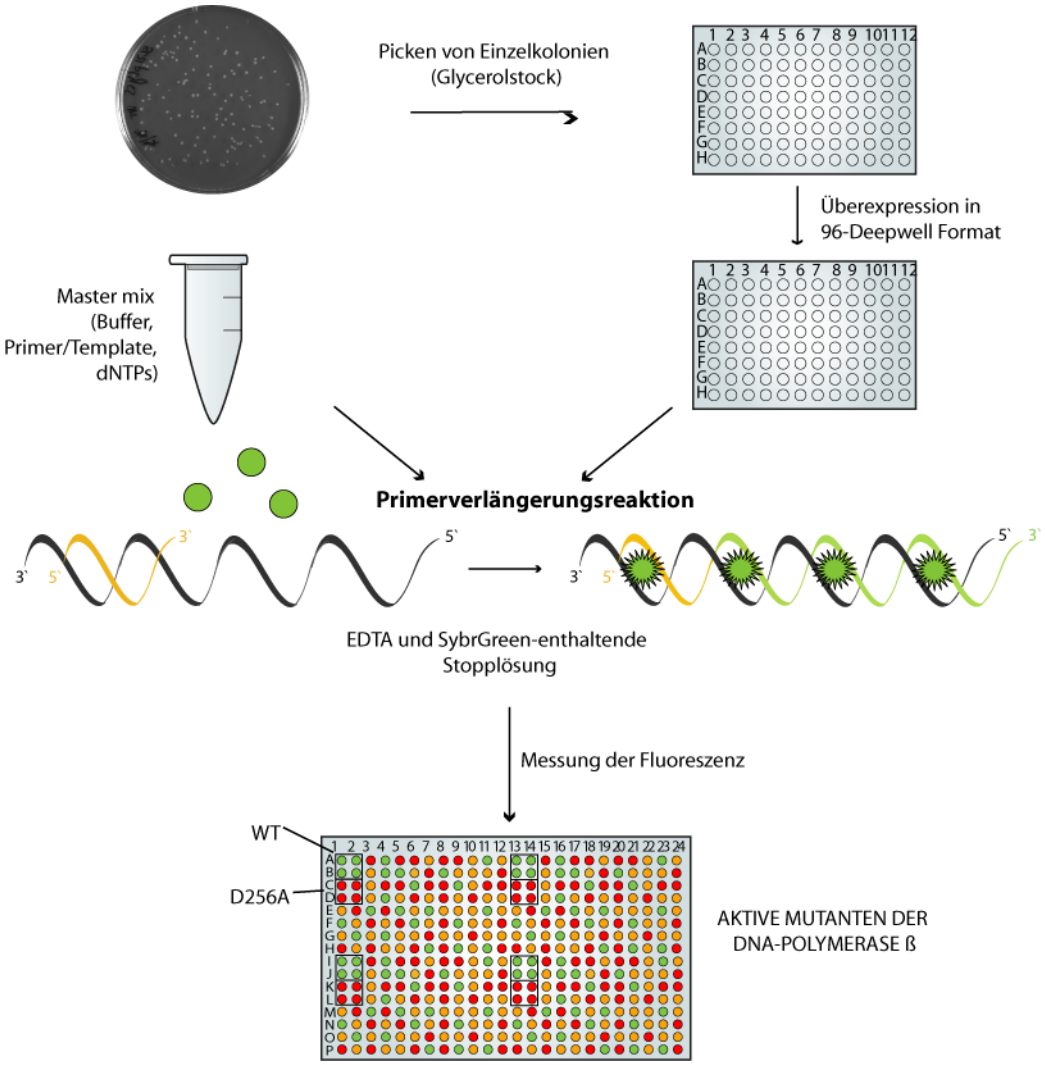


Abbildung 39: Graphische Darstellung der benutzten Mutanten-Screening Methode. Kolonien, die für mutierte Varianten der Polβ codierenden Plasmide trugen, wurden einzeln gepickt und in Hochdurchsatzplatten kultiviert. Direkt aus den *E. coli*-Extrakten der Mutanten wurde ein Aktivitätstest durchgeführt und die aktiven Enzyme wurden in einem weiteren Schritt charakterisiert.

2.2.3.4 Evaluierung des Screenings mit Lysaten

Erneut musste das neue Screeningsystem evaluiert werden. Aus der Expression einer 96-Deepwellplatte mit verschiedenen Mutanten der Bibliothek Pool3 wurden Lysate hergestellt, die auf Aktivität getestet wurden. Die Verlängerungsreaktion eines Primers durch die verschiedenen Polβ Mutanten wurde sowohl radiometrisch als auch mit dem SybrGreen I Assay detektiert. Problematisch bei der Arbeit mit Lysaten ist die Interferenz der *E. coli*–eigenen DNA-Polymerasen, die auch zur Verlängerung des Primers beitragen können. Außerdem kann die freigesetzte genomische DNA der Bakterien den Farbstoff SybrGreen I binden und ein Fluoreszenzsignal hervorrufen.
Wie in Abbildung 40 gezeigt, konnten die Polβ WT-enthaltenden Lysate den Primer zu einem Vollendprodukt verlängern. Diese Lysate wiesen ebenfalls ein starkes Fluoreszenzsignal im SybrGreen I Assay auf. Die Polβ D256A-enthaltenden Lysate konnten trotz *E. coli* DNA-Polymerasen den Primer nicht verlängern und entsprechend niedrig war das Fluoreszenzsignal. Die verschiedenen Mutanten zeigten unterschiedliche Fluoreszenzsignale, die auf unterschiedliche Aktivitäten hindeuteten.
Dem gemessenen Fluoreszenzsignal der verschiedenen Varianten wurde der Background abgezogen. Als Background galt der Durchschnittswert der gemessenen Fluoreszenz für die vier Negativkontrollen (Polβ D256A-enthaltende Lysaten), die auf derselben 96-Deepwellplatte exprimiert worden waren. Außerdem wurde das Signal normalisiert, indem alle Fluoreszenzwerte durch den höchsten Wert auf der Platte geteilt wurden.

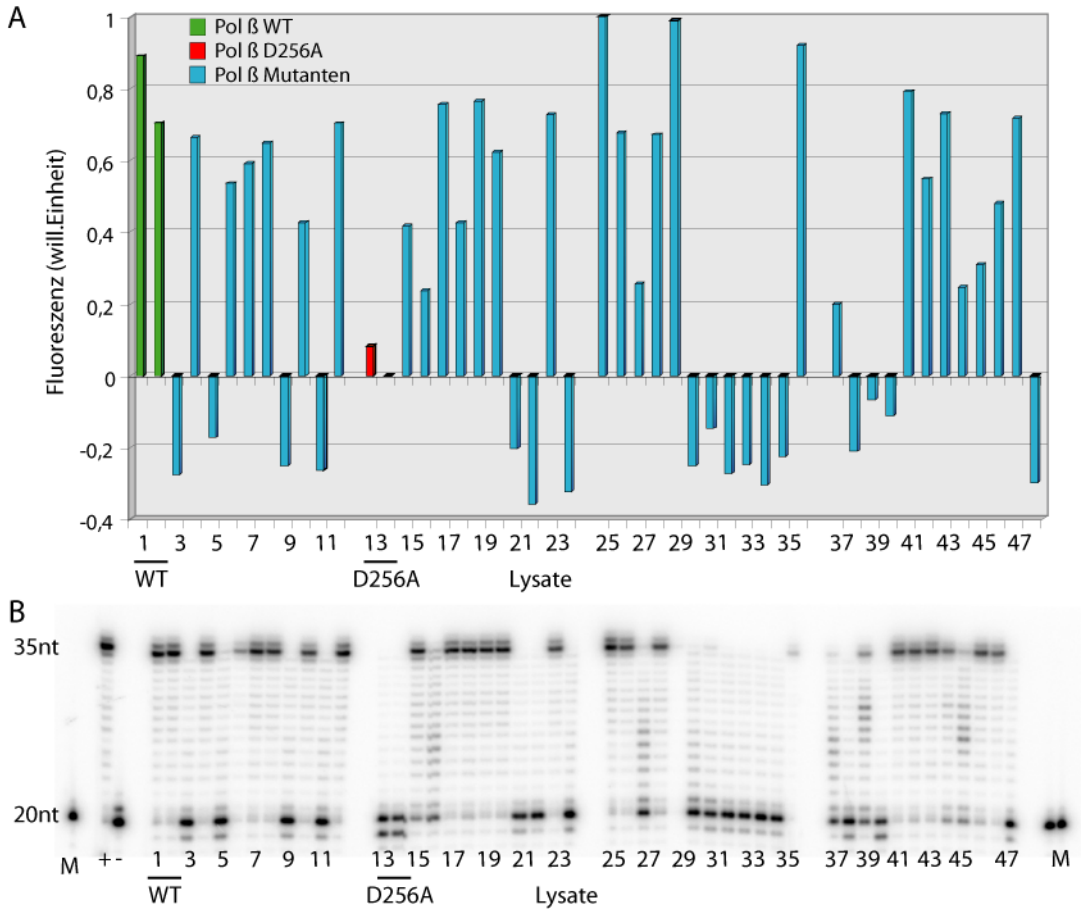


Abbildung 40: (A) Endpunktmessung der SybrGreen I – vermittelten Fluoreszenz von dsDNA zur Aktivitätsmessung der Polβ-Aktivität. Zu einer Lösung von unmodifiziertem Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat: F90A) und 200µM dNTP in Reaktionspuffer wurden 5µl des Lysats gegeben und die Reaktionsmischung 30min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt und die gebildete Menge dsDNA mittels SybrGreen I-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 520nm quantifiziert. Die Reaktionen, die mit hPolβ WT-Lysaten bzw. hPolβ D256A-Lysaten durchgeführt wurden, sind in der Abbildung gekennzeichnet. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit denselben Polβ-Lysaten wie in (A) zur Kontrolle des Fluoreszenz-basierten Screeningtests. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F35), 5µl Lysat und 200µM dNTPs. Reaktionen wurden 30min bei 37°C inkubiert. M: Primermarker. Bahn + und -: Primerverlängerungsreaktionen mit aufgereinigter Polβ WT und D256A. Bahn 1-2: Primerverlängerungsreaktionen mit Polβ WT-Lysaten. Bahn 13-14: Primerverlängerungsreaktionen mit Polβ D256A-Lysaten. Bahn 3-12, 15-48: Primerverlängerungsreaktionen mit Polβ Mutanten-Lysaten. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Als aktive Varianten galten die Mutanten, die mindestens 60% des Durchschnittswerts der gemessenen Fluoreszenz für vier Positivkontrollen (Polβ WT-enthaltende Lysaten) beweisen konnten.

2.2.3.5 Durchmusterung der Mutantenbibliothek

Nachdem die Anwendbarkeit des Screeningsystems festgestellt worden war, konnte die Durchmusterung der Mutantenbibliothek der Polβ stattfinden. Verteilt über zehn 384-Deepwellplatten wurden 6688 Mutanten gepickt und durchmustert. Zuerst wurde die Aktivität dieser Mutanten ermittelt. 2714 Varianten (ca. 40%) konnten eine Polymerase-Aktivität auf einem unbeschädigten Primer/Templat-Komplex (F20thioAG/F90A) zeigen. Alle aktiven DNA-Polymerasen wurden mithilfe eines Pipettierroboters in neuen 384-Deepwellplatten vereint und für das Screening nach Bypass-Eigenschaften benutzt.

Das Ziel dieses Screenings war, die Größe der Bibliothek so einzuschränken, dass die möglichen interessanten Varianten später in einem genaueren Test charakterisiert werden konnten.

Zwei verschiedene Ansätze für das Screening nach Bypass-Aktivität wurden angewandt (siehe Abbildung 41). Eine Primerverlängerungsreaktion wurde mit einem Templat durchgeführt, das in der „standing start" Position (die erste Base im Templat nach dem 3´-Ende vom Primer) eine stabile abasische Stelle enthält (F90Ap). Die erwünschte DNA-Polymerase sollte in der Lage sein, über einen Schaden zu synthetisieren. Parallel wurde auch eine Reaktion mit unmodifizierter DNA aber in der Gegenwart von nur drei dNTPs (dCTP, dGTP und dTTP) durchgeführt. Dieser Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass Reparaturpolymerasen oft weniger selektiv sind als z.B. Replikationspolymerasen. Allerdings können TLS-Polymerasen DNA-Schäden besser replizieren als die Polymerasen, die in der Replikation involviert sind [10]. Das Templat F90A enthält acht Thymine an nicht hintereinander liegender Position. Die Polymerase muss dementsprechend viele Fehleinbauten sowie deren Verlängerungen durchführen können. Diese Situation kann zu einer strukturellen Veränderung der DNA-Konformation führen, die der Gegenwart eines DNA-Schadens ähneln kann. Durch diese Methode konnten unter anderem *Loeb* und *Holliger* aus einer Mutantenbibliothek der *Taq* DNA-Polymerase und *Glöckner* aus der *KlenTaq* DNA-Polymerase eine Variante finden, die ein erhöhtes Bypass-Muster vorwies [134, 168, 173] .

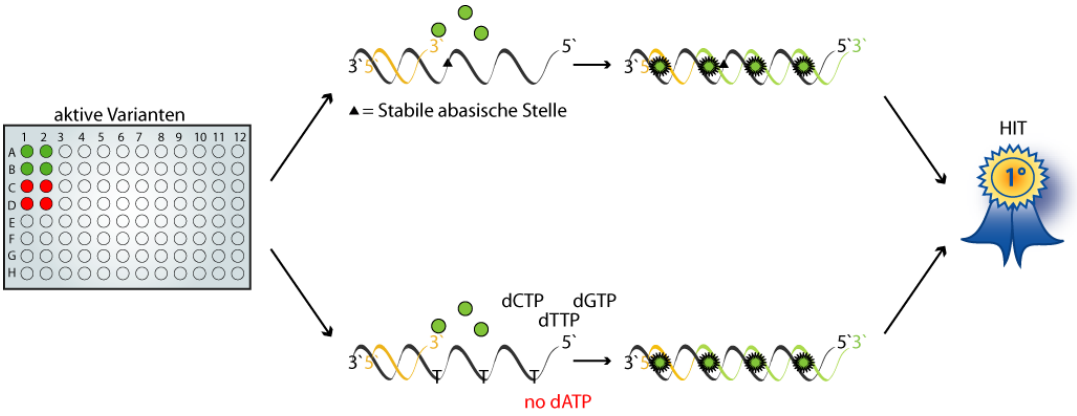


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Bypass-Screenings. Die aktiven varianten der Polβ wurden parallel in zwei verschiedenen Reaktionen getestet. Eine Primerverlängerungsreaktion wurde in der Gegenwart von einem mit einer stabilen abasischen Stelle-modifizierten Templat (F90Ap) durchgeführt. Zusätzlich wurde auch eine Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart von einem unmodifizierten Templat aber nur drei dNTPs (dCTP, dGTP und dTTP) durchgeführt.

Die 2714 aktiven Varianten der Polβ wurden mithilfe von diesem doppelten Ansatz auf Bypass-Aktivität durchmustert.

Problematisch bei dem Test mit dem beschädigten Templat ist, dass in der Gegenwart hoher Konzentrationen an Enzym, der Wildtyp ebenfalls die abasische Stelle überlesen konnte. Da die Konzentration der Polymerase im Lysat nicht einfach ermittelbar ist, wurde eine Kontrollreaktion für jede einzelne Variante auf derselben Platte mit dem unmodifizierten Templat durchgeführt. Wichtig für eine verbesserte Bypass-Eigenschaft der Mutanten war das Verhältnis des Fluoreszenzwertes der Reaktion mit der unmodifizierten gegen beschädigte DNA. Die Aktivität mit einem unmodifizierten Templat war im ersten Teil des Screenings bei allen Varianten schon festgestellt worden. Somit wurden nur solche Mutanten ausgesucht, die in der Gegenwart von beiden Templaten den Primer vergleichbar gut verlängern konnten. Als positiv wurden die Mutanten ausgewertet, bei denen dieses Verhältnis ($F_{\text{unmodifizierte DNA}}/F_{\text{beschädigte DNA}}$, wobei F das Fluoreszenzsignal ist) kleiner als 1,2 war. Zusammenfassend, konnten mit dieser Auswertung die Mutanten ausgesucht werden, die das beschädigte Templat genauso gut wie das unbeschädigte prozessieren konnten.

Wie in Abbildung 42 gezeigt, war beispielweise beim Wildtyp die Fluoreszenz bei der Kontrollreaktion mit unbeschädigter DNA (dunkelgrüne Balken) ca. 1,5 bis 2-fach so hoch wie die Fluoreszenz der Reaktion mit dem beschädigten Templat (hellgrüne

Balken). In der Negativkontrolle war die Fluoreszenz bei beiden Reaktionen vergleichbar niedrig (rote bzw. orangene Balken). Die meisten Mutanten (blau in der Abbildung) zeigten ein WT-ähnliches Verhalten. Bei einigen Mutanten, wie die in der Abbildung 42 in gelb gekennzeichneten, konnte diese Voraussetzung erfüllt werden. Insbesondere die Mutante 5P20, nach der Position auf der 384-Deepwellplatte benannt, zeigte ein stärkeres Fluoreszenzsignal bei der Reaktion mit beschädigter DNA im Vergleich zum Wildtyp sogar bei der Kontrollreaktion mit unmodifizierter DNA.

Insgesamt konnte bei 54 Varianten nach dem Screening mit dieser Methode eine erhöhte Bypass-Eigenschaft nachgewiesen werden.
Bei der Reaktion mit unmodifiziertem Templat ohne dATP wurde eine Positivkontrolle mit allen vier dNTPs ausschließlich für Wildtyp und D256A-Mutante durchgeführt.

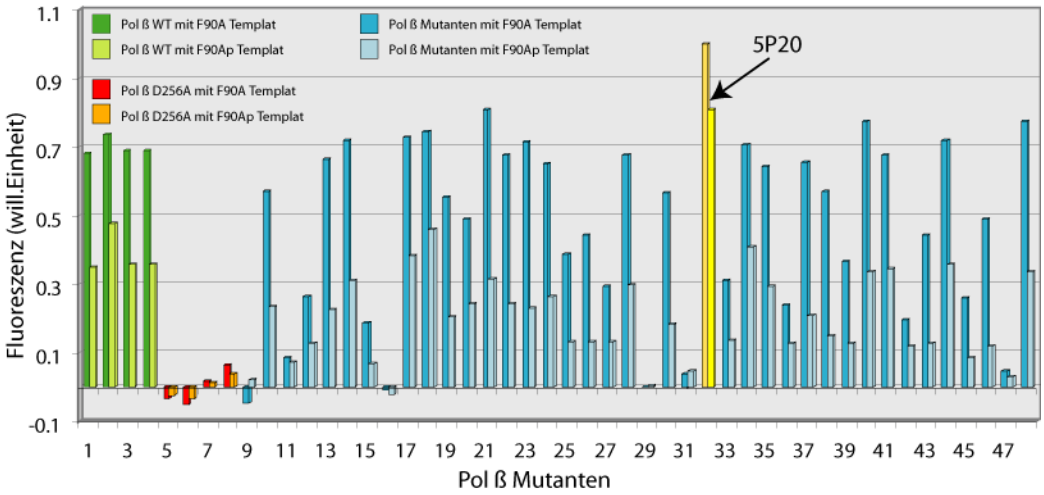


Abbildung 42: Endpunktmessung der SybrGreen I – vermittelten Fluoreszenz von dsDNA zur Aktivitätsmessung von Polβ Lysaten aus *E. coli* Zellen. Zu einer Lösung von unmodifiziertem oder einer stabilen abasischen Stelle enthaltendem Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat: F90A oder F90Ap) und 200µM dNTP in Reaktionspuffer wurde Rohlysat von expressionsinduzierten *E. coli* gegeben, die einen für Polβ WT, Polβ D256A oder zufällige Mutanten kodierenden Vektor enthielten und die Reaktionsmischung wurde 30min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt und die gebildete Menge dsDNA mittels SybrGreen I-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 530nm quantifiziert. Die Fluoreszenz wurde mittels Plattenlesegerät ermittelt.

Wie in Abbildung 43 gezeigt, war das Fluoreszenzsignal der Kontrollreaktion in der Gegenwart des WT-Enzyms ca. doppel so hoch wie das der Reaktion ohne dATP. Die Negativkontrolle mit der D256A-Mutante zeigte wieder ein niedriges Fluoreszenzsignal

in beiden Reaktionen. Das Ziel des Screenings war, die Größe der Bibliothek so einzugrenzen, dass die genauere Durchmusterung der möglichen Treffer durchgeführt werden konnte. Deswegen wurden die Bedingungen nicht so stringent gewählt. Als Treffer wurden die Mutanten eingestuft, die bei der Reaktion ohne dATP ein Fluoreszenzsignal zeigen konnten, das mindestens 60% des Durchschnittswertes der Positivkontrolle betrug.

Keine der 2714 aktiven Mutanten konnte eine starke Fluoreszenz ohne dATP erzielen, d.h. keine Variante einschließlich WT konnte ohne dATP den Primer gut verlängern. Aus 2714 aktiven Varianten konnten jedoch sechzehn die ausgewählten Bedingungen erfüllen. Diese Mutanten wurden für eine genauere Beobachtung in einer radiometrischen Primerverlängerungsreaktion bestimmt.

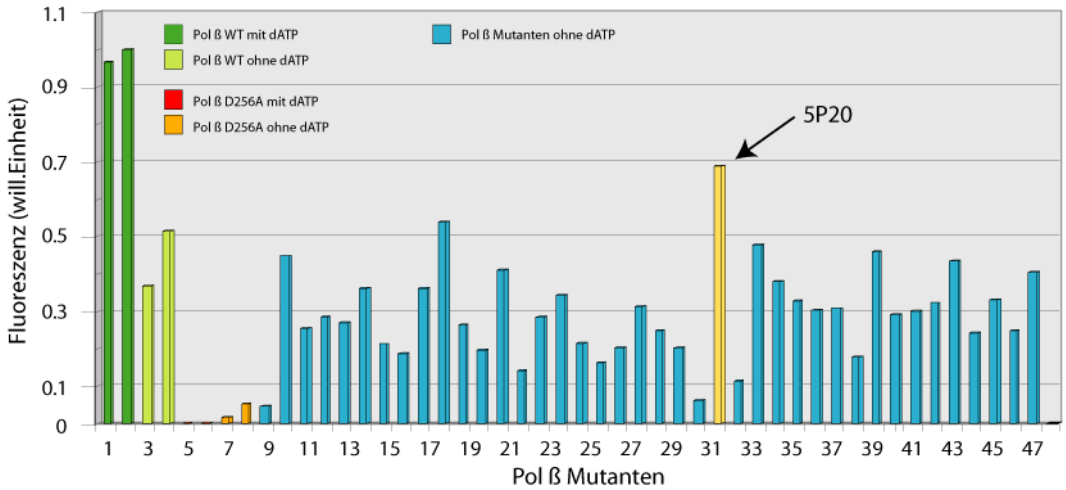


Abbildung 43: Endpunktmessung der SybrGreen I – vermittelten Fluoreszenz von dsDNA zur Aktivitätsmessung von Polβ Lysaten aus *E. coli*. Zu einer Lösung von unmodifiziertem Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat F90A) und 200µM dNTP mit oder ohne dATP in Reaktionspuffer wurde Rohlysat von expressionsinduzierten *E. coli* gegeben, die einen für Polβ WT, Polβ D256A oder zufällige Mutanten kodierenden Vektor enthielten und die Reaktionsmischung wurde 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt und die gebildete Menge dsDNA mittels SybrGreen I-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 530nm quantifiziert. Die Fluoreszenz wurde mittels Plattenlesegerät ermittelt.

Zwei verschiedene Mutanten, 4A3 und 5P20, erfüllten in beiden Screenings (mit abasischer Stelle und ohne dATP) die oben genannten Bedingungen.

2.2.3.6 Radiometrische Untersuchung der ermittelten Mutanten

Die Mutanten, die sich als Treffer in beiden Screenings herausgestellt haben, wurden weiter in einer radiometrischen Primerverlängerungsreaktion charakterisiert. Weiterhin wurden Rohlysate benutzt, die genauso erstellt wurden, wie in 2.2.3.1 beschrieben.

Die Analyse der Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart beschädigter DNA zeigte, dass die meisten Treffer sogenannte „falsche Positive“ waren (Abbildung 44). Alle getesteten Varianten konnten in der Gegenwart von unbeschädigter DNA polymerisieren, aber die meisten konnten an der abasischen Stelle nicht vorbeisynthetisieren. Nur die Mutante 5P20 konnte einen erhöhten Bypass über eine abasische Stelle bestätigen. Diese Mutante konnte den Primer sogar bis zum Volllängenprodukt verlängern.

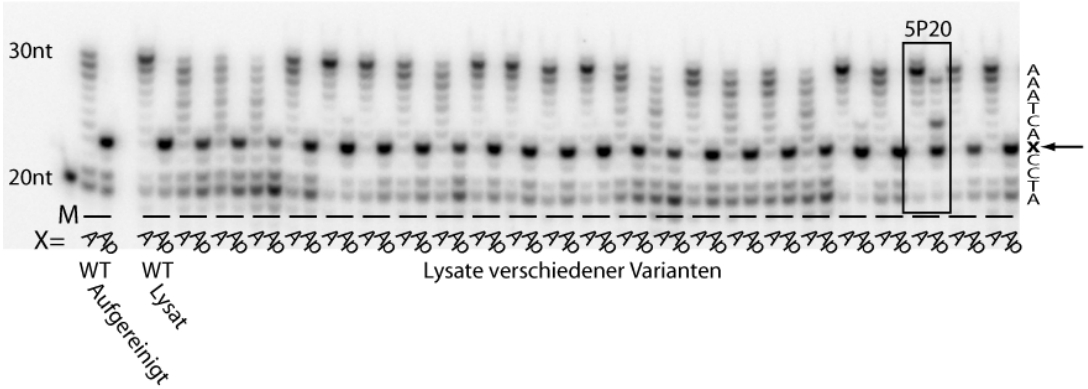


Abbildung 44: Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit Polβ-Lysaten der Treffer aus dem Screening mit beschädigter DNA. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20thioAG, Templat: F33A oder F33Ap), 5µl Lysat, 200µM dNTPs. Reaktionen wurden 30min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen sind immer links die Kontrollreaktion mit unbeschädigter DNA (A) und rechts die mit beschädigter DNA (Ap) für Polβ WT und den verschiedenen Mutanten. M: Primermarker. Links: Primerverlängerungsreaktionen mit aufgereinigter Polβ WT. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Die Analyse der Treffer aus dem Screening ohne dATP zeigte ein ähnliches Bild (Abbildung 45). Viele Mutanten konnten den Einbau gegenüber dem ersten Thymin im Templat aufweisen, aber die meisten Varianten konnten kein Volllängenprodukt synthetisieren. Hier konnte die 5P20 Mutante auch in der Abwesenheit von dATP den Primer bis zum Volllängenprodukt verlängern.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Mutante 5P20 für eine genaue Charakterisierung

ausgewählt.

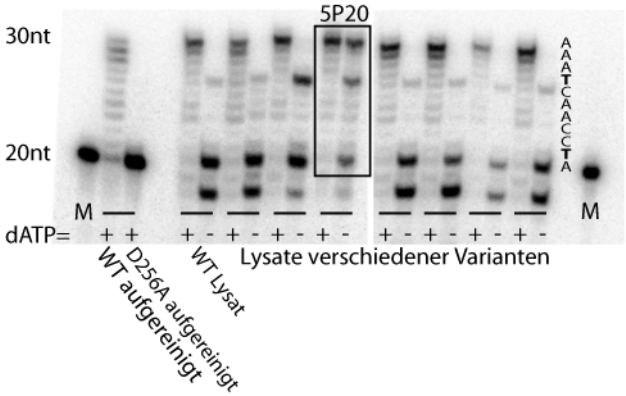


Abbildung 45: Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit Polβ-Lysaten der Treffer aus dem Screening mit unbeschädigter DNA ohne dATP. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F33A), 5µl Lysat, 200µM dNTPs. Reaktionen wurden 30min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen ist links die Kontrollreaktion mit allen vier dNTPs (+) und rechts die ohne dATP (-) für Polβ WT und verschiedene Mutanten. M: Primermarker. Links: Primerverlängerungsreaktionen mit aufgereinigter Polβ WT und Polβ D256A. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

2.2.3.7 Diskussion der Ergebnisse aus den Durchmusterungen der Polβ-Mutantenbibliotheken

In diesem Teil der Arbeit wurde ein Screeningsystem entwickelt, um eine Mutantenbibliothek eines humanen Enzyms auf neue, verbesserte Eigenschaften zu testen. Das optimale System sollte erlauben, schnell, effektiv und kostengünstig solche Varianten zu durchmustern. Die benutzte Methode wurde schon früher in der AG Marx von *Summerer* entwickelt und führte zu Erfolgen in der Evolution verschiedener DNA-Polymerasen. Das Screening basiert auf einer Primerverlängerungsreaktion, deren Endpunkt mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen I detektiert werden kann.

In dieser Arbeit wurde diese Methode für die Durchmusterung von Varianten der Polβ optimiert. Die verschiedenen Varianten werden im Idealfall im HTS-Format rekombinant hergestellt und direkt aus dem *E. coli*-Rohlysat in eine Primerverlängerungsreaktion eingesetzt. Einige Expressionstests wurden im größeren Maßstab (5-20ml Expressionsvolumen) durchgeführt und die Anwendbarkeit der erhaltenen Lysate wurde direkt in einer Primerverlängerungsreaktion geprüft.

Verschiedene Störfaktoren ließen diese Experimente scheitern. Zuerst wurde der Primer während der Reaktion vermutlich durch *E. coli*-eigene Nukleasen abgebaut. Die Lösung zu diesem Problem wurde in der Verwendung von PTO-modifizierten Primern gefunden, die bekannterweise beständiger gegen Nukleasen sind [175]. Außerdem war die Konkurrenz der *E. coli*–eigenen DNA-Polymerasen sehr stark. Der Primer wurde in allen Fällen verlängert, auch wenn die katalytisch inaktive Mutante der Polβ D256A überexprimiert wurde. Dies führte zum Beschluss, alle Mutanten mittels Affinitätschromatographie im 96-Well-Format aufzureinigen. Somit wurde eine erste Bibliothek von 3520 Varianten gescreent. Aus 1302 aktiven Mutanten wurde eine Polymerase gefunden, die tatsächlich einen leicht erhöhten Bypass über eine stabile abasische Stelle zeigen konnte. Eine zweite Runde Evolution konnte jedoch die Eigenschaften der Mutante 2N7 nicht verbessern. Deswegen wurde eine neue Methode gesucht, um schneller, effektiver und mit höherem Durchsatz ein Screening durchführen zu können.

Die Lösung der Expressionsprobleme in 96-Well-Format wurde in der Optimierung des für die Polβ codierenden Gens nach dem Kodon-Gebrauch der *E. coli* gefunden. Mit diesem Expressionssystem konnten die Lysate direkt in der Primerverlängerungsreaktion eingesetzt werden und somit konnte der Durchsatz der Durchmusterung eindeutig gesteigert werden.

Verschiedene Methoden zur Herstellung der Mutantenbibliothek wurden angewandt. Zuerst wurde das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Stratagene benutzt. Die Vorteile dieser Methode sind die einfache Handhabung, die hohe Produktausbeute und die Tatsache, dass die Neigung des Fehlerspektrums in Richtung Transitionen über Transversionen durch die Mischung aus zwei verschiedenen DNA-Polymerasen gehoben wurde. Nur die Templatkonzentration und die Anzahl der Zyklen der PCR-Reaktion müssen angepasst werden, um eine besondere Mutationsrate zu erzielen. Nachteilig sind die hohen Kosten. Fünf verschiedene Reaktionen, die sich in der Templatmenge unterschieden, wurden parallel angesetzt. Um eine größere Menge an Produkt für die Klonierungen zu erstellen, wurden die Produkte aus dieser Reaktion wieder mithilfe der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Die Mutationsrate wurde nur für den Ansatz mit

wenig Templat kontrolliert (Pool1-100, siehe 2.2.2.4.1 und 3.3.2.1), indem das Insert aus zehn Klonen sequenziert wurde. Die Mutationsrate erwies sich als relativ niedrig, mit ca. 5- bis 10-fach weniger Mutationen als die angegebene Frequenz (17 Mutationen auf ca. 10 000 sequenzierten Basen, d.h. 0,17%. Siehe auch Tabelle 5). Außerdem wurden drei Wildtypsequenzen vorgefunden und eine Mutation, nämlich E335D, kam viermal vor. Die Tatsache, dass eine Mutation so oft vorkam, kann mehrere Gründe haben. Es könnte sich sowohl um die Folge des Frühentstehens dieser Mutation in der Mutagenese-Reaktion handeln, die dann während der error prone-PCR (ep-PCR) in der Population der Mutanten verbreitet wurde. Es könnte jedoch auch eine Anreicherung dieser Mutation in der anschließenden Amplifikation erfolgt sein.

Eine zweite Methode wurde anschließend getestet, die auch auf dem Prinzip der ep-PCR basiert. Dafür wird die Fehleranfälligkeit der *Taq* DNA-Polymerase in der Gegenwart von Mn^{2+}-Ionen ausgenutzt. Diese Methode weist eine Tendenz des Fehlerspektrums in Richtung Transitionen über Transversionen auf, insbesondere A zu G-Mutationen [136]. Um dieses Phänomen zu reduzieren, wurden unterschiedliche Konzentrationen an dNTPs benutzt (5mM dATP und dGTP und 25mM dCTP und dTTP; siehe 3.3.2.2). Die Fehlerrate kann auch durch die Templatkonzentration und die Anzahl der Zyklen der PCR-Reaktion angepasst werden, und zusätzlich kann die $MnCl_2$-Konzentration variiert werden. Dies allerdings benötigt eine intensivere Optimierung im Vergleich zur vorherigen Methode. Entscheidender Vorteil dem Stratagene Kit gegenüber sind die Kosten. Deswegen war hier keine Notwendigkeit, das Produkt nochmal mit einer anderen DNA-Polymerase zu amplifizieren, um eine ausreichende Menge für die Klonierung zu erhalten, weil direkt große Ansätze durchgeführt werden konnten.

Insgesamt zwanzig Klone aus zwei Bibliotheken (Pool2 und Pool3, siehe 2.2.2.4.2 und 2.2.3.2) wurden sequenziert. Unter Verwendung dieser Mutagenese wurden keine Wildtyp-Sequenzen erhalten. Zwei Deletionen verursachten bei zwei Mutanten einen Frameshift. Insgesamt wurden 1,5- bis 2-fach mehr Mutationen erhalten, als beim GeneMorph II Kit (58 Mutationen auf ca. 20 000 sequenzierten Basenpaaren, d.h. 0,3%, mit ausgeglichenen Transversionen und Transitionen).

Da sich die zwei Methoden in der Ausbeute an Mutationstypen und Mutationsanzahl nicht entscheidend unterschieden, wurde die preiswertere Variante gewählt.

Bei der Durchmusterung der Pool3-Bibliothek wurden zuerst die Mutanten der Polβ auf Aktivität getestet. 6688 Mutanten wurden hierbei in kürzester Zeit durchmustert. Davon konnten 2714 Mutanten eine Polymerase-Aktivität auf unbeschädigter DNA zeigen. Als nächster Schritt wurde die Durchmusterung auf erhöhte Bypass-Aktivität über eine stabile abasische Stelle oder auf verringerte Selektivität getestet. Für die Bypass-Reaktion wurde ein 90-Nukleotide langes Templat verwendet, das an der ersten Position nach dem Primerende eine stabile abasische Stelle trug. Parallel wurde eine Reaktion mit unbeschädigter DNA durchgeführt, wobei nur drei dNTPs anwesend waren. Diese Reaktion sollte die Selektivität der Mutanten prüfen. In der Tat besitzen viele TLS-Polymerasen eine relativ niedrige Selektivität [10]. Aus diesen Screenings ergaben sich 54 bzw. 16 Treffer, die genauer untersucht wurden. Die radiometrische Primerverlängerungsreaktion bestätigte nur jeweils einen Treffer, der bei beiden Reaktionen derselbe war. Die Variante 5P20 konnte sowohl einen erhöhten Bypass über eine abasische Stelle als auch die Fähigkeit vorweisen, in der Gegenwart von nur drei dNTPs ein Volllängenprodukt zu synthetisieren (Abbildung 44 und Abbildung 45). Die Idee, nach einem weniger selektiven Enzym zu suchen, um eine Variante zu finden, die Bypass über DNA-Schäden vorzeigt, hatte sich als erfolgreich bestätigt.

Aus den insgesamt 70 erzielten Treffern nach den beiden Screenings hatte sich bloß einer in der radiometrischen Kontrollreaktion bestätigt. Die Tatsache, dass so viele „falsche positive“ Treffer gefunden wurden beruht wahrscheinlich darauf, dass eine nicht so stringente Auswertung der Fluoreszenzwerte ausgewählt worden war. Ziel des SybrGreen I Assays war jedoch die Bibliotheksgröße zu verringern und erst danach die möglichen interessanten Mutanten akkurat zu durchmustern. Um möglichst wenige Treffer zu verfehlen, wurde die Auswertung nicht so streng ausgewählt. Das spiegelt sich in den Ergebnissen aus den radiometrischen Untersuchungen wieder. Die Tatsache, dass doch eine Variante gefunden wurde, die die erwünschte Eigenschaft zeigte, deutet drauf hin, dass der Ansatz dafür geeignet war.

Mehrere Male wurde in unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit gezeigt, dass kleinere Bibliotheken mit wenigen Tausenden Mutanten eine gute Basis für die gerichtete Evolution von Proteinen sein können. Mehrere interessante Mutanten von verschiedenen DNA-Polymerasen wurden entdeckt, wie z.B. selektivere Varianten der *Taq* DNA-Polymerase [133] oder des Klenow Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* [130], Varianten der *KlenTaq* DNA-Polymerase mit Reverse Transkriptase Aktivität [131] oder verbesserter Substratakzeptanz [134] . Das deutet daraufhin, dass diese Art der Enzymevolution erfolgreich sein kann, auch wenn die Größe der Bibliothek im Vergleich zur Anzahl der theoretisch möglichen Mutanten sehr begrenzt ist.

2.2.4 Charakterisierung der Polβ-Mutante 5P20

2.2.4.1 Einleitung

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde mithilfe eines Screenings einer randomisierten Mutantenbibliothek der Polβ eine Variante isoliert, die eine verbesserte Überlesefunktion vorweisen konnte. Die Variante 5P20 wurde für eine komplette Charakterisierung ausgewählt. Die Aminosäuresequenz dieser Mutante wurde bestimmt. Der Bypass verschiedener DNA-Schäden, wie die abasische Stelle, 8-oxo-dG und 8-oxo-dA, wurde überprüft und kinetische Untersuchungen, sowie spezifische Aktivität und Prozessivität des Enzyms wurden gemessen.

2.2.4.2 Sequenzierung der Mutante 5P20

Das für die 5P20-Variante codierende Plasmid wurde isoliert (siehe 3.4.4) und die DNA-Sequenz des ORFs wurde von der Fa. GATC Biotech bestimmt. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte fünf verschiedene Mutationen innerhalb des gesamten Gens (Abbildung 46). Eine dieser Mutationen führte zu keinem Aminosäureaustausch, somit wurden vier Aminosäure-Mutationen im Protein festgestellt. Das Alignment der Proteinsequenzen des Wildtyps mit der 5P20-Mutante ist in 5.5.2 gezeigt.
Serin2 befindet sich in der Lyase-Domäne der Polβ (grün in Abbildung 47) direkt nach dem Start-Methionin, während sich die weiteren Mutationen an den Positionen Phenylalanin99, Glutamat232 und Valin269 in der Polymerase-Domäne befinden (grau in der Abbildung).
Der Austausch von Serin zu Glycin an Position 2 bewirkt vermutlich keine große Veränderung in der Struktur des Enzyms, da beides neutrale und kleine Aminosäuren sind und dieser Rest weit außerhalb des aktiven Zentrums in einem flexiblen Bereich am N-Terminus des Proteins liegt.

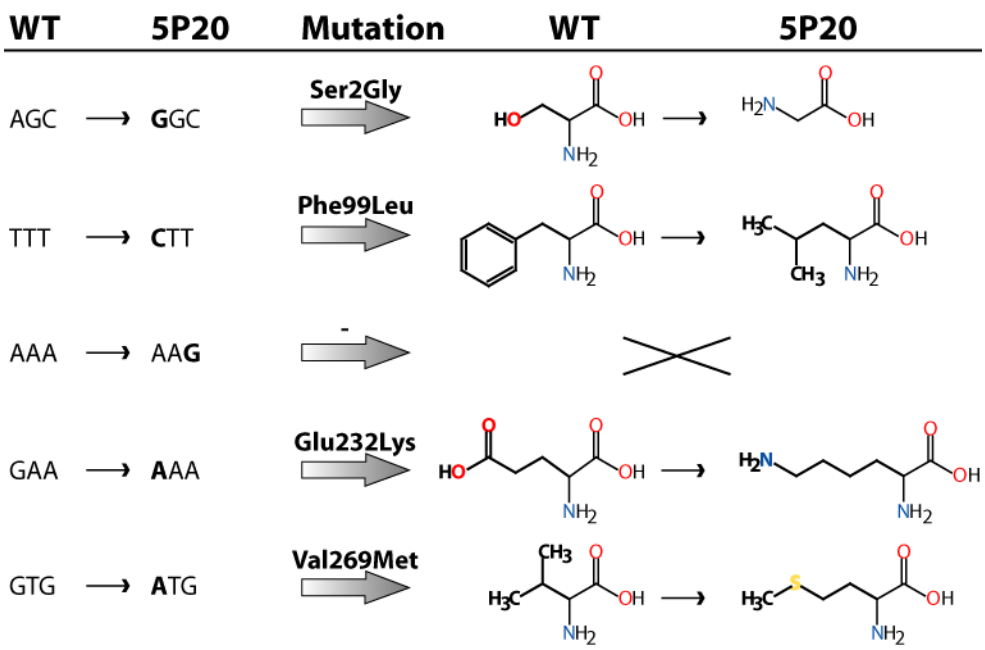


Abbildung 46: Schematische Darstellung der in der Variante 5P20 vorgefundenen Mutationen. Die Mutationen sind sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene angegeben. Fett: ausgetauschte Nukleotide und Seitenketten der Aminosäuren.

Phenylalanin99 liegt innerhalb eines Helix-hairpin-Helix Motivs (HhH2), das aus den Helices F und G im Fingerbereich besteht (Aminosäuren Asp92 bis Gly118) [39]. Die in der Nähe liegenden Aminosäuren Gly105, Gly107, Ser109 und Ala110 sind in Wasserstoffbrückenbindungen zum Primerstrang involviert und es wird vermutet, dass sie für dessen Positionierung verantwortlich sind [38].

Sowohl Phenylalanin als auch Leucin sind apolare Aminosäuren. Phenylalanin trägt jedoch zusätzlich einen aromatischen Ring in der Seitenkette. Das Fehlen stabilisierender hydrophober Wechselwirkungen zwischen aromatischen Gruppen könnte eventuell die Struktur des Proteins stören.

Ein zweites Cluster von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen DNA und Protein befindet sich im β-turn zwischen den zwei β-Faltblattbereichen 3 und 4 auf der Handfläche. Die Stickstoffe im Protein-Rückgrat der Aminosäuren Lys230, Thr233 und Lys234 interagieren mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat des Templatstranges. Das Glutamat232 befindet sich innerhalb dieser Sequenz.

Der Austausch einer sauren anionischen gegen eine basische kationische Aminosäure ist die Mutation, die die Polarisierung der Seitenkette am stärksten verändert. Die Nähe

der positiven Ladung dieser Seitenkette zum anionischen Zucker-Phosphat-Rückgrat des Templatstranges lässt einen starken Effekt vermuten.

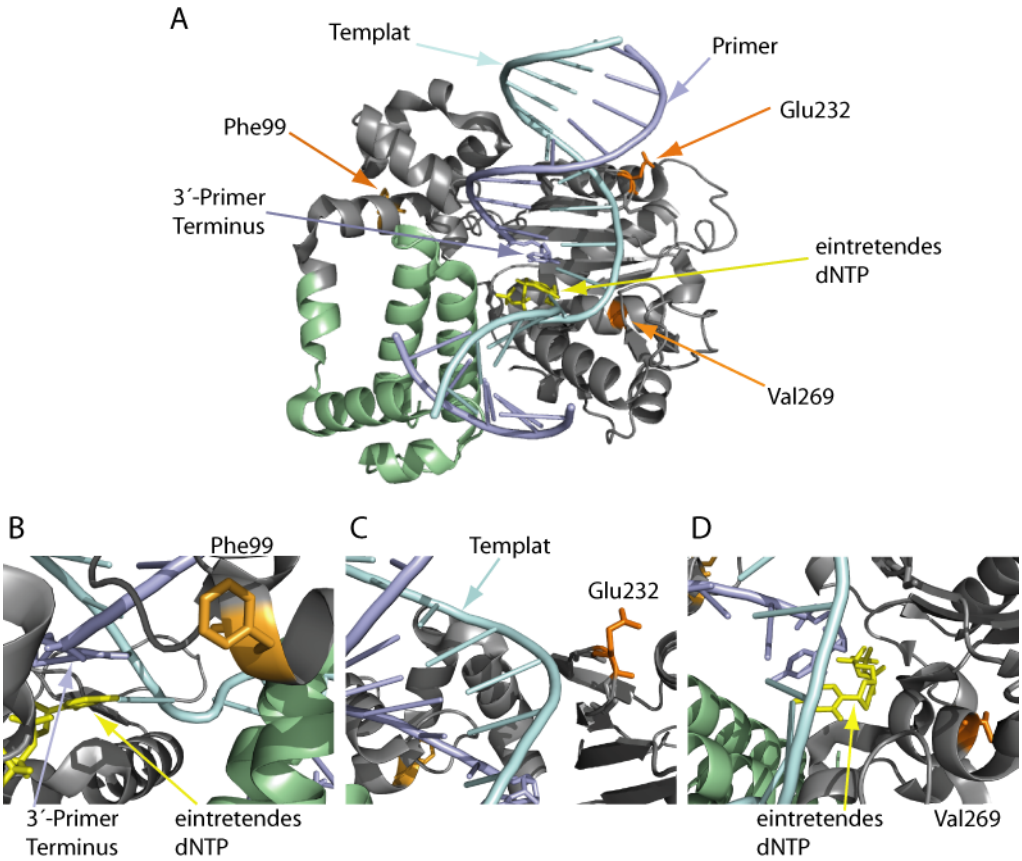


Abbildung 47: Darstellung der Positionen der Mutationen in der Variante 5P20. Die Lyase-Domäne ist in grün dargestellt, die Polymerase-Domäne in grau; Templat- und Primerstrang sind in hell- bzw. dunkelblau, das eintretende dNTP ist in gelb dargestellt. Die Positionen der Mutationen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. A: Gesamtübersicht des Proteins. B: Position der Mutation Phe99Leu. C: Position der Mutation Glu232Lys. D: Position der Mutation Val269Met. PDB-Eintrag: 2FMP.

Das Valin269 befindet sich im Daumen in der Nähe der sogenannten „hydrophoben Gelenkregion“ („hydrophobic hinge region“) der Polβ, die als Drehpunkt für das Schließen der Fingerdomäne verantwortlich ist. Valin und Methionin sind beides apolare Aminosäuren.

Eine auffällige Beobachtung ist, dass aus der ersten Durchmusterung einer Mutantionbibliothek der Polβ eine Variante isoliert wurde, die eine Mutation an derselben Stelle vorwies (Val269Ile siehe 2.2.2.6).

2.2.4.3 Expression und Reinigung der Polβ WT und der Variante 5P20

Um die Eigenschaften der isolierten Variante charakterisieren zu können, war es erforderlich, diese in einer homogenen Lösung zu gewinnen. Beide rekombinanten Proteine wurden als Fusionskonstrukt mit einem N-terminalen His-Tag hergestellt. Daraufhin wurden die für den Wildtyp und die Mutante codierenden Plasmide in *E. coli* XL10-Gold transformiert. Die Reinigung wurde wie für die 2N7-Mutante beschrieben (2.2.2.6) durchgeführt.

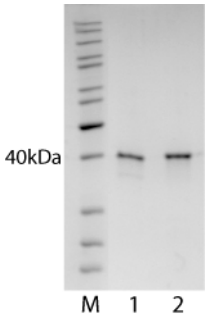


Abbildung 48: N-terminal 6-Histidin-getaggte Polβ WT und Mutante 5P20 nach Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker. Bahn 1: Polβ WT. Bahn 2: Polβ 5P20.

Für den Wildtyp war ein weiterer Reinigungsschritt über eine Ionentauscherchromatographie erforderlich (3.5.3). Die Enzyme wurden anschließend dialysiert und Glycerol wurde zu einer Konzentration von 50% beigemischt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (3.5.7) und die Proteine wurden bei -20°C gelagert. Ein Beispiel der Reinigung ist in Abbildung 48 gezeigt.

2.2.4.4 Untersuchung der Bypass-Eigenschaften der Variante 5P20 über verschiedene DNA-Schäden

Zuerst wurden die Bypass-Eigenschaften über verschiedene DNA-Schäden der neuen Polβ Variante in einem „standing start“ Kontext überprüft. Drei verschiedene DNA-Schäden wurden untersucht, die durch die Basenexzisionsreparatur (BER) in der Zelle

beseitigt werden: die abasische Stelle, 8-Oxo-desoxyadenosin und 8-Oxo-desoxyguanosin. Die abasische Stelle kann durch die Depurinierung oder Depyrimidierung von Nukleotiden entstehen. Dieses Phänomen kann sowohl durch exogene als auch durch endogene Faktoren verursacht werden (siehe 1). Außerdem wurden zwei Oxidationsprodukte der natürlich vorkommende Nukleotide Desoxyadenosin und Desoxyguanosin benutzt. Diese oxidierten Nukleotide tragen ein Sauerstoff an Position 8 der Purine (Abbildung 49). Solche Läsionen können z.B. durch die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) entstehen [23]. 8-oxo-dG kann eine Falschpaarung mit dA eingehen und somit, wenn nicht repariert, zu einer Transversion führen (G-C zu T-A).

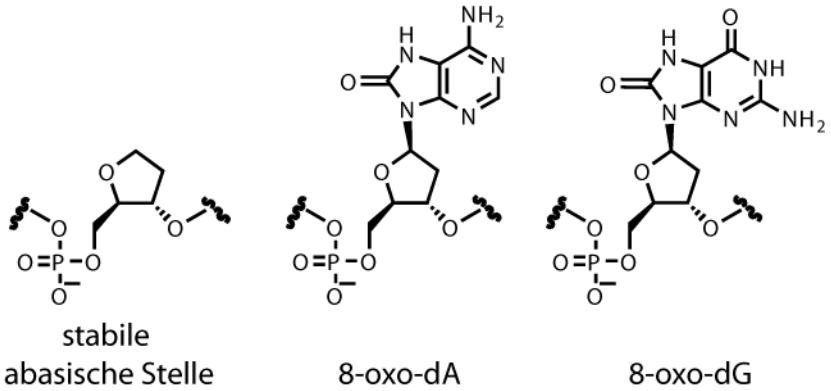


Abbildung 49: Struktur der untersuchten DNA-Schäden.

Erste Primerverlängerungsversuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen an DNA-Polymerase durchgeführt. Der Primer (F20TH) wurde an verschiedene Template angelagert, die entweder keine Modifikation (F33A) oder jeweils einen DNA-Schaden (stabile abasische Stelle: F33Ap; 8-oxo-dA: F33oA; 8-oxo-dG: F33oG. Für die Sequenzen siehe Abbildung 50A) enthielten. In Abbildung 50B sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Bei allen Enzymkonzentrationen konnten sowohl der Wildtyp als auch die Mutante über die unmodifizierte DNA F33A bis zum Volllängenprodukt synthetisieren. In der Gegenwart einer abasischen Stelle an der vierten Position nach dem 3´-Primerterminus konnte der Wildtyp, auch bei hohen Konzentrationen an Polymerase, nur drei Nukleotide einbauen. Das zeigte, dass der Wildtyp sehr schlecht den Einbau gegenüber der abasischen Stelle erzeugte. Die 5P20-

Mutante konnte schon bei niedrigeren Enzymkonzentrationen ein Nukleotid gegenüber der abasischen Stelle einbauen und dieses Produkt noch um eine Base verlängern. Bei hohen Konzentrationen konnte die Mutante den Primer bis zum Volllängenprodukt verlängern.

Im Gegensatz zu den abasischen Stellen sind die oxidativen Schäden für die Polβ eine geringere Blockade. Trotzdem sieht man einen deutlichen Unterschied bei niedrigen Enzymkonzentrationen. Die Mutante konnte den Primer bis zum Volllängenprodukt verlängern, während der Wildtyp nur ein gegenüberstehendes Nukleotid einbauen konnte und dieses Produkt um zwei Basen verlängern konnte. Bei hohen Konzentrationen waren die Unterschiede nicht mehr so deutlich.

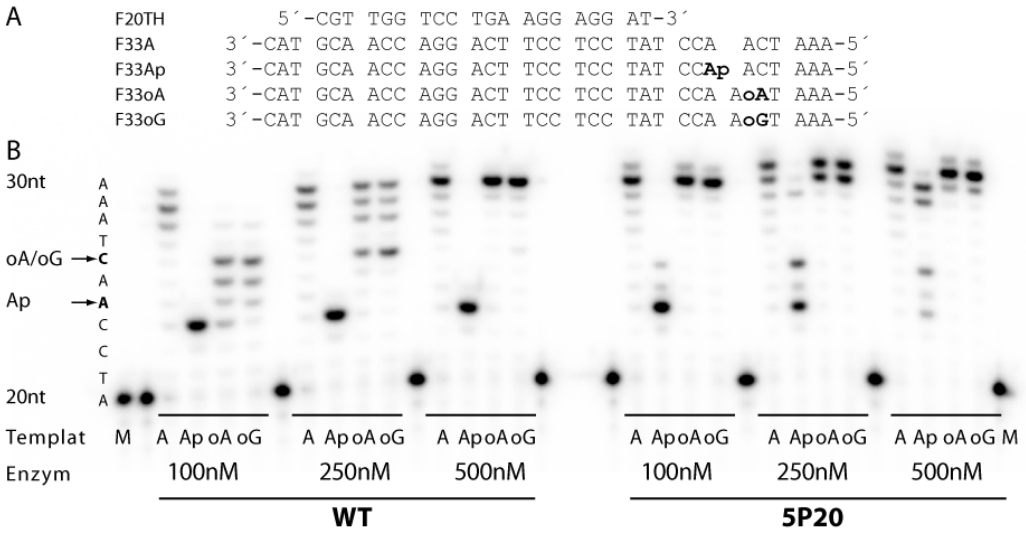


Abbildung 50: „Running start" Untersuchung der Bypass-Eigenschaften der Polβ WT und der Variante 5P20. (A) Sequenzen der verwendeten Primer/Templat-Komplexe. In fett sind die Positionen der verwendeten Modifikationen gekennzeichnet. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ WT und hPolβ 5P20. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex, verschiedene Mengen an Polymerase und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen sind von links die Kontrollreaktion mit unbeschädigter DNA (A), die Reaktion mit dem Templat mit stabiler abasischer Stelle (Ap), 8-oxo-dA (oA) und 8-oxo-dG (oG) für Polβ WT und Polβ 5P20. Drei verschiedene Konzentrationen an Enzym wurden benutzt (100nM, 250nM und 500nM). M: Primermarker. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Zu beobachten ist, dass die Mutante 5P20 bei hohen Konzentrationen an Enzym das Volllängenprodukt weiter um ein Nukleotid verlängerte. Das Produkt, das bei dem mit der abasischen Stelle modifizierten Templat F33Ap entstand, war jedoch ein Gemisch

aus hauptsächlich zwei Produkten. Eines entsprach der vollständigen Verlängerung des Templatstranges (*n*) wobei ein anderes um eine Base verkürzt vorlag (*n*-1). Das könnte darauf hindeuten, dass während der Replikation der abasischen Stelle mit der 5P20-Mutante ein Frameshift entstanden ist. Dieses Phänomen wurde schon für die Polβ WT gezeigt [179].

Untersucht wurde auch welches Nukleotid gegenüber der abasischen Stelle eingebaut wurde. Die Primerverlängerungsreaktionen wurden in der Gegenwart von einem Primer durchgeführt, dessen 3´- Primerterminus direkt vor der Modifikation anlagerte.

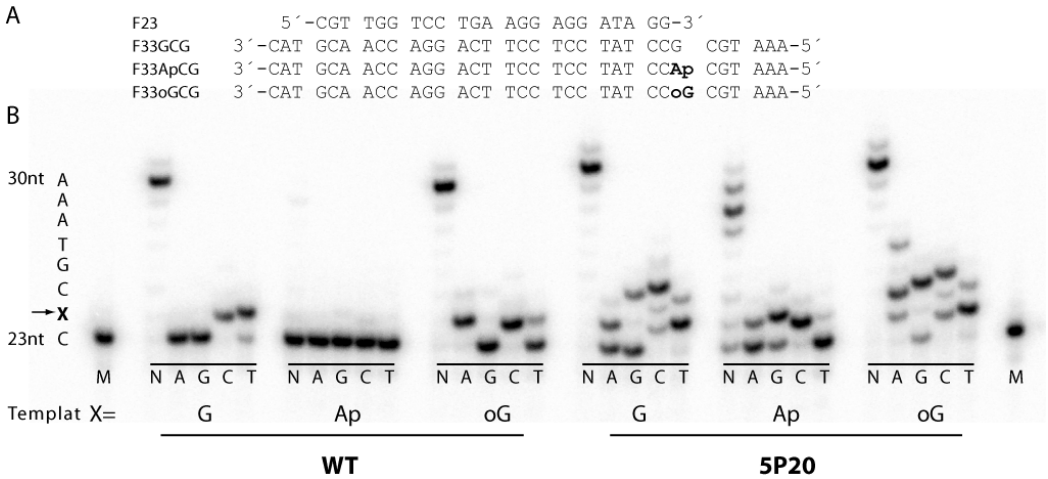


Abbildung 51: „Standing start" Untersuchung der Bypass-Eigenschaften der Polβ WT und der Variante 5P20. (A) Sequenzen der verwendeten Primer/Templat-Komplexe. In fett sind die Positionen der verwendeten Modifikationen gekennzeichnet. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ WT und hPolβ 5P20. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex, 500nM Polymerase und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen sind von links die Kontrollreaktion mit unbeschädigter DNA (G), die Reaktion mit dem Templat mit stabiler abasischer Stelle (Ap) und 8-oxo-dG (oG) für Polβ WT und Polβ 5P20. M: Primermarker. Bahn N: alle vier dNTPs. Bahn A: nur dATP. Bahn G: nur dGTP. Bahn C: nur dCTP. Bahn T: nur dTTP. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Der Wildtyp konnte den Primer in Gegenwart aller vier dNTPs und dem unmodifizierten Templat, das ein Guanosin an der ersten Position nach dem Primerterminus enthielt, zum Volllängenprodukt verlängern und baute sowohl dCTP als auch dTTP gegenüber des Guanosins ein (Abbildung 51). Gegenüber der abasischen Stelle konnte der Wildtyp keine Base einbauen, auch nicht in der Gegenwart von allen vier dNTPs. Wie schon früher beschrieben wurden bei der 8-oxo-dG-Modifikation vom

Wildtyp das Volllängenprodukt erreicht und sowohl dCTP als auch dATP wurden eingebaut [180]. dTTP, auch wenn nur zu einem geringen Anteil, wurde ebenso eingebaut.

Das Ergebnis der Mutante 5P20 zeigte entscheidende Unterschiede zum Wildtyp. Bei allen Templaten konnte die Mutante den Primer zur Volllänge verlängern. Gegenüber dem Guanosin am unmodifizierten Templat konnte sie dCTP und dTTP effektiv einbauen. dATP und dGTP konnten auch eingebaut werden, jedoch zu einem geringeren Anteil. Gegenüber der abasischen Stelle konnte am besten dCTP eingebaut werden, aber auch dATP und dGTP konnten prozessiert werden. Das Volllängenprodukt in diesem Fall scheint wieder ein Gemisch aus verschiedenen Produkten zu sein, wobei ein *n*-1, ein *n* und ein *n*+1 Produkt entstehen (*n* entspricht der Länge des Templats).

Gegenüber 8-oxo-dG wurden genauso wie beim Wildtyp am besten dCTP und dATP eingebaut, jedoch wurden alle vier dNTPs inkorporiert. In der Gegenwart von nur dATP konnten von der Mutante vier nacheinander folgende Fehleinbauten durchgeführt werden.

Da es schon in der Literatur beschrieben ist, dass die Bypass-Eigenschaft der Polβ über eine abasische Stelle Templat-abhängig ist, wurde dies für die Mutante 5P20 untersucht. Primerverlängerungsreaktionen wurden mit verschiedenen Templaten durchgeführt, die je eines der vier Nukleotide abwärts der abasischen Stelle enthielten [179, 180].

Die Wildtyp-Polymerase, sowie die 5P20-Mutante, konnten den unmodifizierten Primer in der Gegenwart von allen vier dNTPs bis zum Volllängenprodukt verlängern (Abbildung 52). In der Gegenwart von einer stabilen abasischen Stelle reduzierte sich die Effizienz der Reaktionen in allen Fällen. Der Wildtyp konnte kaum den Primer verlängern. Allerdings, im Fall von einem Guanosin nach der abasischen Stelle sieht man einen geringen Einbau von dCTP; im Fall vom Cytosin im Templat wurden sowohl dGTP als auch dCTP eingebaut; im Fall vom Thymin war das Ergebnis für den WT nicht eindeutig. Bei der Mutante 5P20 spiegelte sich dieselbe Situation wieder, wobei die Primer viel besser verlängert wurden. Im Fall von einem Thymin im Templat konnte die Mutante eindeutiger sowohl dATP als auch dCTP einbauen.

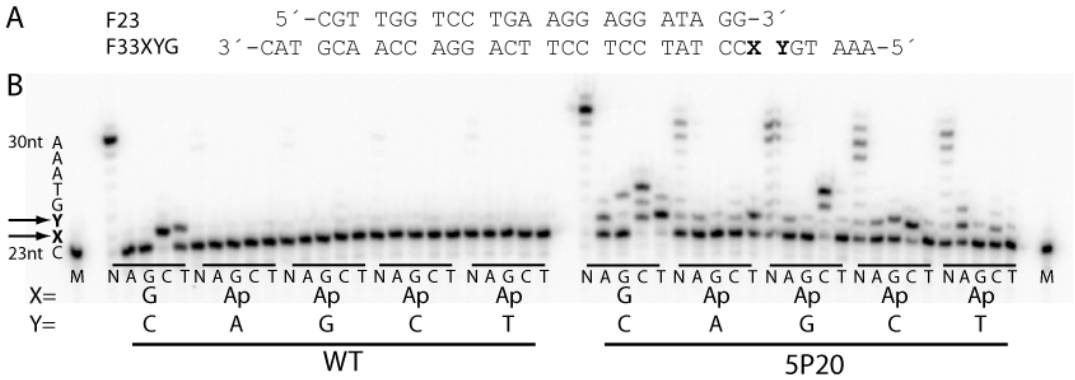


Abbildung 52: Einfluss der Templatsequenz auf die Bypass-Eigenschaften über eine abasische Stelle für die Polβ und 5P20. (A) Sequenzen der verwendeten Primer/Templat-Komplexe. In fett sind die Positionen der verwendeten Modifikationen gekennzeichnet. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ WT und hPolβ 5P20. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex, 500nM Polymerase und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen sind von links die Kontrollreaktion mit unbeschädigter DNA (X=G, Y=C) und die Reaktionen mit den verschiedenen Templaten mit stabiler abasischer Stelle (Ap) für Polβ WT und Polβ 5P20. M: Primermarker. Bahn N: alle vier dNTPs. Bahn A: nur dATP. Bahn G: nur dGTP. Bahn C: nur dCTP. Bahn T: nur dTTP. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Zusammenfassend konnten die Mutante 5P20, und zu einem kleinen Anteil auch der Wildtyp, immer das Nukleotid einbauen, das komplementär zur ersten Base abwärts der abasischen Stelle war. dCTP konnte gegenüber allen Basen eingebaut werden, auch wenn in den meisten Fällen mit einer niedrigeren Effizienz.

2.2.4.5 Untersuchung der spezifischen Aktivität und Prozessivität

Weitere Merkmale der 5P20-Variante, wie spezifische Aktivität und Prozessivität, wurden ebenfalls untersucht. Die spezifische Aktivität eines Enzyms definiert sich als die Menge an dNTPs, die die DNA-Polymerase pro Zeiteinheit und Enzymeinheit einbaut. Um diese Eigenschaft zu testen wurden Primerverlängerungsreaktionen mit steigender Enzymkonzentration durchgeführt. Diese Enzymkonzentrationen wurden so ausgewählt, dass der Umsatz der Reaktionen nicht vollständig stattfand (linearer Bereich). Der Umsatz wurde aus der Intensität der Bande mittels Phosphorimaging-Methoden berechnet und anschließend gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Die

Steigung der linearen Auswertung bezeichnet die spezifische Aktivität des Enzyms.

Wie man von Abbildung 53 entnehmen kann, besitzt die 5P20-Variante eine höhere spezifische Aktivität als der Wildtyp. In der Tat konnte der Wildtyp 148,8 ± 6,1fmol dNTPs pro fmol Enzym pro Minute einbauen, während die Mutante ca. dreimal so viel dNTPs einbauen konnte (434,8 ± 16,7fmol dNTPs pro fmol Enzym pro Minute).

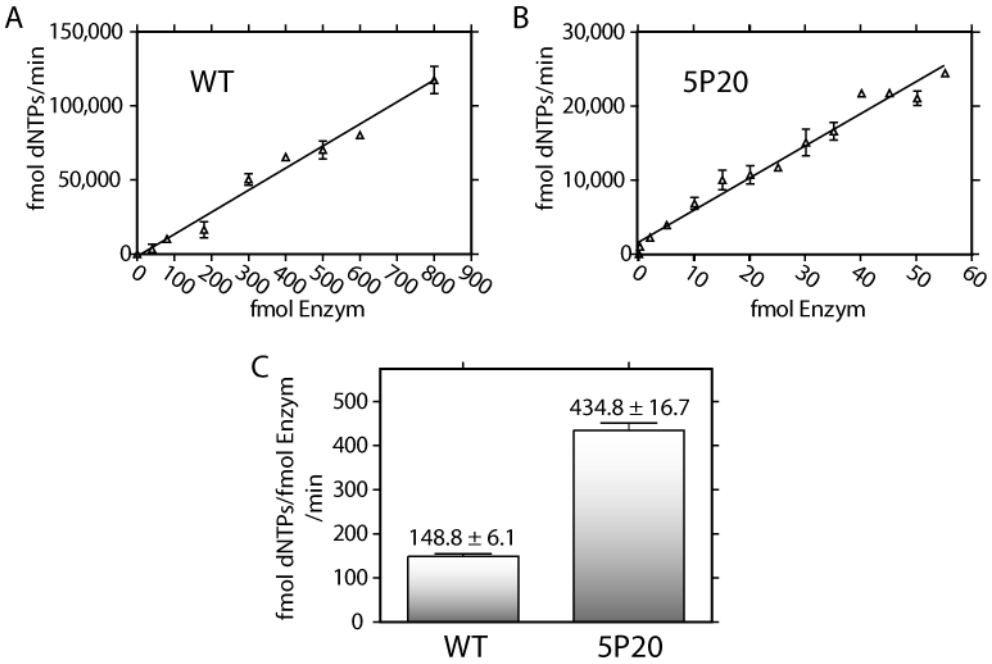


Abbildung 53: Messung der spezifischen Enzymaktivität der Polβ WT und der Variante 5P20. In (A) und (B) sind die Mengen an eingebauten dNTPs gegen die Menge von benutztem Enzym (fmol dNTPs/min gegen fmol Enzym) aufgetragen. (A) Messung für den Wildtyp. (B) Messung für die 5P20 Variante. (C) Auswertung der spezifischen Aktivität für WT und 5P20.

Außerdem wurde die Prozessivität der Enzyme gemessen. Dafür wurde eine Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart einer Falle durchgeführt. Zuerst wurde das Enzym an die DNA gebunden. Zum Start der Reaktion wurde ein Gemisch an dNTPs und Falle zugegeben. Dadurch konnte das Enzym den Primer verlängern, bis es von der DNA dissoziiert ist. Die Polymerase wurde daraufhin von der Falle eingefangen und konnte nicht wieder an die DNA binden. Somit wurde die Reaktion nach dem ersten Polymerisationsschritt gestoppt. Als Falle wurde Heparin benutzt. Wie in Abbildung 54 gezeigt, konnten beide Enzyme in der Abwesenheit der Falle den Primer verlängern. In der Gegenwart von Heparin konnte der Wildtyp maximal zwei, die

Mutante jedoch bis zu sechs dNTPs einbauen. Beide Enzyme zeigten wenige Einbauten pro Polymerisationsablauf, was ein Merkmal eines distributiven Verhaltens in der Polymerisationsreaktion ist. Dieses Verhalten wurde schon für den Wildtyp in der Literatur beschrieben [113].

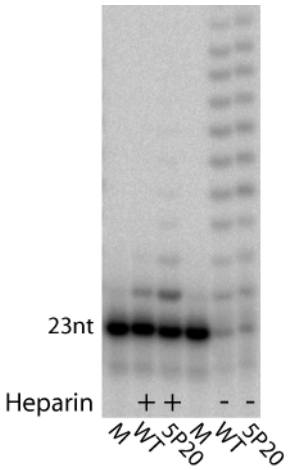


Abbildung 54: Untersuchung der Prozessivität der Polβ WT und der Variante 5P20. Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit hPolβ WT und hPolβ 5P20. Die Reaktionen enthielten 10nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F23, Templat: F90A), 20nM Polymerase und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen sind die Reaktion mit (+) und ohne Heparin (-) für Polβ WT und Polβ 5P20. M: Primermarker. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

2.2.4.6 Bindungsaffinität zur DNA

Da die Verbesserung der Bypass-Eigenschaften über oxidative Schäden nicht sehr deutlich war, wurde im Folgenden die Bindungsaffinität nur zum Primer/Templat-Komplex untersucht, die eine abasische Stelle enthielt.

Während der Polymerisationsreaktion komplexiert die DNA-Polymerase zuerst die dsDNA und erst dann das einkommende dNTP. Die Konformation der untersuchten DNA könnte durch die abasische Stelle verändert sein und dadurch zu einer veränderten Affinität des Enzyms für dieses Substrat führen [181, 182]. Diese Affinität wurde mithilfe von EMSA-Methoden gemessen (electrophoretic mobolity shift assay) [126]. Wenn die DNA-Polymerase gebunden ist, hat der Primer/Templat-Komplex während einer Polyacrylamidelektrophorese unter nativen Bedingungen eine veränderte Mobilität

im Vergleich zum freien Komplex. Die Quantifizierung dieser Bindung erfolgte mittels Phosphorimaging-Methoden (Abbildung 55).

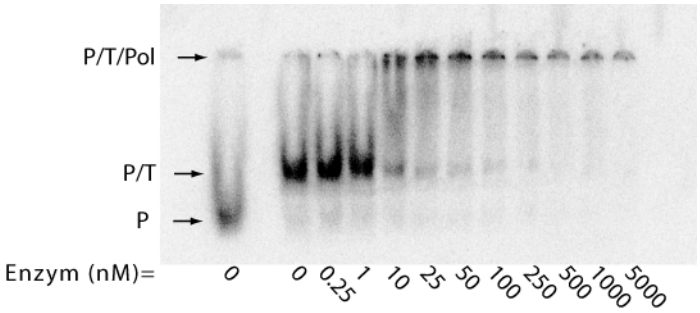


Abbildung 55: Messung der Affinitätskonstante der Polβ 5P20 zum Primer/Templat-Komplex. Autoradiogramm der nativen PAGE-Auftrennung von Bindungsreaktionen mit hPolβ 5P20. Die Reaktionen enthielten 0,1nM Primer/Templat-Komplex und verschiedene Enzymkonzentrationen wie angegeben in einem Bindungspuffer. Die Reaktionen wurden 10min bei 20°C inkubiert. P: Primer. P/T: Primer/Templat-Komplex. P/T/Pol: Primer/Templat/Polymerase-Komplex. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Der Prozentsatz des gebundenen Komplexes wurde gegen die Konzentration der DNA-Polymerase aufgetragen und mit einer nicht-linearen Regression ausgewertet ($Y=m_1*X/(K_d+X)+c$, wo Y= Anteil gebundenes Komplexes; X= Enzymkonzentration; K_d= Affinitätskonstante; m_1= Maßstabfaktor; c= scheinbar Minimum Wert für Y). Die Zusammenfassung der Bindungskonstanten ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Affinitätskonstanten der DNA-Polymerasen β WT und 5P20 zum unmodifizierten oder mit abasischer Stelle modifizierten Primer/Templat-Komplex.

	Unbeschädigte DNA (nM)	Beschädigte DNA (nM)
WT	265,6 ± 59,9	246,8 ± 50,5
5P20	7,1 ± 1,1	10,3 ± 3,8

Die Mutante 5P20 zeigte eine 25- bis 35-fach stärkere Bindung zum Primer/Templat-Komplex im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings änderte sich die Affinität für die beschädigte DNA im Vergleich zur unbeschädigten in beiden Fällen kaum.

2.2.4.7 Kinetische Untersuchungen

Die Quantifizierung der oben vorgestellten Beobachtungen wurde mittels pre-steady-state Kinetiken durchgeführt. Somit sollte einen Eindruck gewonnen werden, wie sich die Bypass-Eigenschaft durch die Mutationen verbessert hatte. Pre-steady-state Kinetiken messen die Geschwindigkeit der Reaktion schon bevor ein Gleichgewicht entsteht. Dies wird erreicht, indem die Reaktion bei gesättigten Polymerase- und dNTP-Konzentrationen durchgeführt wird, sodass nahezu jedes Primer/Templat-Komplex mit Enzym und Substrat gebunden vorliegt. Für den Fall eines kanonischen Einbaus betragen die Reaktionszeiten nur einige Millisekunden. Deswegen wurde für diese Messung ein Quench Flow-Apparat verwendet, der eine Reaktion innerhalb von 2 Millisekunden starten und stoppen kann (Abbildung 62 im Anhang) [183, 184]. Für längere Reaktionszeiten als fünf Sekunden, wie bei nicht-kanonische Einbauten oder in der Gegenwart von beschädigter DNA, wurden diese Reaktionen per Hand durchgeführt.
Mit dieser Methode wurden sowohl der Einbau gegenüber einer unbeschädigten Base oder einer stabilen abasischen Stelle gemessen, als auch der Verlängerungsschritt untersucht.

2.2.4.7.1 Untersuchung auf unbeschädigtem Templat

Zuerst wurde die Kinetik des Einbaus gegenüber einer unbeschädigten Base gemessen. Sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit (k_{pol}), als auch die Affinität des Enzyms zum dNTP ($K_{d\ dNTP}$) wurden gemessen. Daraus kann man die Effizienz der Reaktion als Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit zur Substrataffinität (k_{pol}/K_D) berechnen. In Tabelle 9 ist die Zusammenfassung der Daten gelistet, die aus dem kanonischen Einbau von dCTP oder dem nicht-kanonischen Einbau von dTTP gegenüber Guanosin entstanden sind. Die Einbaugeschwindigkeit von dCTP gegenüber dem Guanosin des Wildtyps und der 5P20-Mutante betrugen 2,2 ± 0,1s^{-1} bzw. 3,3 ± 0,1s^{-1}. Diese Werte

entsprechen den in der Literatur vorhandenen und sind untereinander vergleichbar [154, 185]. Die Affinität der beiden Enzyme zum Substrat unterscheidet sich. Der Wildtyp zeigte eine ca. 15-fach schwächere Interaktion mit dem eintretenden dNTP als die Mutante 5P20 (202 ± 25µM bzw. 12,2 ± 1,2µM). Somit konnte die Mutante 5P20 eine 25-fach höhere Effizienz für diese Reaktion unter den gewählten Bedingungen zeigen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der kinetischen Parameter von kanonischem und nicht-kanonischem Einbau gegenüber Guanosin durch die Polβ WT und die Variante 5P20. [a] Relative Effizienz der Reaktion im Vergleich zum kanonischen Einbau vom WT: $(k_{pol}/K_D)_{Enzym\ dNTP}$ / $(k_{pol}/K_D)_{WT\ dCTP}$ oder zur 5P20-Variante: $(k_{pol}/K_D)_{5P20\ dNTP}$ / $(k_{pol}/K_D)_{5P20\ dCTP}$.

dCTP
dTTP

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GG-3´
3´-CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CC**G** CGT AAA-5´

	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Relative Effizienz zum WT oder zu (5P20) [a]
WT	G : dCTP	2,2 ± 0,1	202 ± 25	11 000	**1**
	G : dTTP	0,047 ± 0,007	1830 ± 419	26	**2,4 x 10^{-3}**
5P20	G : dCTP	3,3 ± 0,1	12,2 ± 1,2	267 000	**25 (1)**
	G : dTTP	0,86 ± 0,02	377 ± 18	2278	**0,21 (8,5 x 10^{-3})**

Im Fall von einem nicht-kanonischen Einbau von dTTP gegenüber Guanosin konnte die Mutante eine 18-fach schnellere Inkorporation im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (0,86 ± 0,02s^{-1} bzw. 0,047 ± 0,007s^{-1}). Bei der Substrataffinität konnten auch Unterschiede gezeigt werden, wobei die Mutante wieder stärkere Interaktionen mit dem einkommenden dNTP zeigte. Allerdings unterschieden sich diese Werte nur um das 5-fache ($K_{d\ dNTP}$ (WT) = 1830 ± 419µM; $K_{d\ dNTP}$ (5P20) = 377 ± 18µM). Im Fall eines Fehleinbaus von dTTP gegenüber Guanosin war die Genauigkeit der 5P20-Mutante 3,5-fach geringer als die des Wildtyps.

Unter den getesteten Bedingungen, erwies sich die 5P20-Mutante als effizienter sowohl im kanonischen als auch im nicht-kanonischen Einbau gegenüber einem Guanosin. In der Tat konnte der Wildtyp den kanonischen Einbau 420-fach besser durchführen als den nicht-kanonischen, während die Mutante bloß 120-fach besser. Ein Verlust in der

Selektivität durch die Mutationen in 5P20 konnte somit festgestellt werden.

2.2.4.7.2 Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle

Folglich wurde der Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle untersucht. Der Einbau von allen vier dNTPs durch beide Enzyme wurde getestet.

Tabelle 10: Zusammenfassung der kinetischen Parameter vom Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle durch die Polβ WT und die Variante 5P20. [a] Relative Effizienz der Reaktion im Vergleich zum Einbau vom WT: $(k_{pol}/K_D)_{Enzym\ dNTP}$ / $(k_{pol}/K_D)_{WT\ dNTP}$.

dNTP

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GG-3´
3´-CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CC**Ap** CGT AAA-5´

	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Relative Effizienz zum WT[a]
WT	Ap : dGTP	n.a.	n.a.	n.a.	-
	Ap : dCTP	n.a.	n.a.	n.a.	-
	Ap : dATP	n.a.	n.a.	n.a.	-
	Ap : dTTP	n.a.	n.a.	n.a.	-
5P20	Ap : dGTP	0,015± 0,002	509± 167	30	-
	Ap : dCTP	0,040 ± 0,003	546 ± 91	73	-
	Ap : dATP	0,0038 ± 0,0003	88,8 ± 34,7	42	-
	Ap : dTTP	n.a.	n.a.	n.a.	-

Der Wildtyp konnte unter den gewählten Bedingungen ausschließlich dGTP einbauen, jedoch konnte nach einer fünfstündigen Inkubation nur eine 50%-ige Ausbeute erreicht werden. Dadurch konnten keine kinetischen Parameter für den WT ermittelt werden. Dieses Verhalten entsprach dem in der Literatur beschriebenen „dNTP-stabilisierten Misalignment“ für die Polβ WT. Demnach wurde ein besserer Einbau von dGTP erwartet, welches komplementär zur ersten Base nach der abasischen Stelle Cytosin war [179]. Zu beobachten ist allerdings, dass *Efrati et al.* ein Templatkontext mit „gapped DNA“ benutzten, das die Prozessivität der Polβ erhöht [186] (siehe 1.3.1).

Die Mutante 5P20 konnte alle dNTPs außer dTTP gegenüber der abasischen Stelle einbauen. Bei allen Reaktionen zeigte diese Variante eine sehr langsame Inkorporationsrate ($k_{pol\ dGTP}$ = 0,015± 0,002s^{-1} und $k_{pol\ dCTP}$ = 0,040 ± 0,003s^{-1}), die besonders langsam beim Einbau von dATP war (0,0038 ± 0,0003s^{-1}).
Die Substrataffinität für dGTP (509 ± 167µM) und dCTP (546 ± 91µM) erwiesen sich als relativ niedrig im Vergleich zu dATP (88,8 ± 34,7µM). Der Vergleich der Effizienz dieser Reaktionen zeigte keinen großen Unterschied. Die Variante 5P20 konnte dGTP, dCTP und dATP gegenüber einer abasischen Stelle einbauen. Insgesamt wurde gezeigt, dass die Effizienz des Einbaus gegenüber der abasischen Stelle durch die Mutationen in 5P20 sehr erhöht wurde.

2.2.4.7.3 Verlängerung nach einer stabilen abasischen Stelle

Um die Verlängerung nach der stabilen abasischen Stelle zu testen wurde ein Primer gewählt, der dieselbe Sequenz hatte wie der vorherige, nur mit einem zusätzlichen Guanosin am 3´-Primerterminus. Ein Guanosin wurde gewählt, weil diese die einzige Base war, die vom Wildtyp gegenüber der abasischen Stelle eingebaut worden war.
Der Einbau sowohl von dGTP, was zur kanonischen Verlängerung führen würde, als auch von dCTP, was ein -1 Frameshift verursachen würde, wurden getestet.
Der Einbau von dGTP wurde vom WT kaum durchgeführt. Die 5P20-Mutante konnte dGTP einbauen, aber nicht zu einer 100%-igen Ausbeute, was wieder zu keiner Aussage über kinetische Parameter führte.
Der Einbau von dCTP wurde von beiden Enzymen durchgeführt. Der Wildtyp und die Mutante konnten dCTP mit einer Rate von 0,16 ± 0,01s^{-1} bzw. 2,3 ± 0,1s^{-1} einbauen.
Die Affinität zum eintretenden dNTP erwies sich als sehr unterschiedlich zwischen beiden Enzyme. Der Wildtyp wies eine K_{ddCTP} von 1970 ± 252µM auf während die Mutante das eintretende dNTP ca. 11-fach besser binden konnte (176,8 ± 18,1µM).
Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich die Effizienz dieser Reaktion durch die Mutationen in 5P20 um das 160-fache verbesserte.

Tabelle 11: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Verlängerung nach dem Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle durch die Polβ WT und Variante 5P20. [a] Relative Effizienz der Reaktion im Vergleich zum Einbau vom WT: $(k_{pol}/K_D)_{Enzym\ dCTP}$ / $(k_{pol}/K_D)_{WT\ dCTP}$.

dCTP

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGG-3´
3´-CAT GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCAp **C**GT AAA-5´

	Templat:dNTP	k_{pol} (s^{-1})	K_D (µM)	k_{pol}/K_D ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Relative Effizienz zum WT[a]
WT	C : dCTP	0,16 ± 0,01	1970 ± 252	80	**1**
5P20	C : dCTP	2,3 ± 0,1	176,8 ± 18,1	13 000	**160**

Sowohl der Einbau gegenüber der abasischen Stelle, als auch die Verlängerung nach dem Einbau waren bedeutende neue Bypass-Eigenschaft dieses Enzyms.

2.2.4.8 Analyse der Einzelmutationen

Wie schon in 2.2.4.2 erläutert, besitzt die isolierte Variante 5P20 vier Mutationen in der Proteinsequenz. Um zu untersuchen, welche von diesen Mutationen tatsächlich verantwortlich für diese neue Eigenschaft sind, wurden alle möglichen Kombinationen dieser vier Austausche kloniert. Vier Einzel-, sechs Doppel- und vier Dreifachmutanten wurden durch ortsgerichtete Mutagenese- und Umklonierungstechniken hergestellt. Alle Mutanten, sowie der Wildtyp, wurden in *E. coli* überexprimiert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (für Details siehe 3.5.3). Die Konzentrationen aller Proteine wurde bestimmt und angeglichen (Abbildung 56A). Die erhaltenen Enzyme wurden in einer Primerverlängerungsreaktion eingesetzt, in der das Templat ein unmodifiziertes Nukleotid oder einen DNA-Schaden enthielt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56B gezeigt. Alle Enzyme konnten den Primer zu einem Volllängenprodukt verlängern. Keine Variante zeigte einen Verlust an Aktivität. Bei dem modifizierten Templat konnte der Wildtyp nicht über dem Schaden synthetisieren, während die 5P20-Variante und andere drei Mutanten es doch konnten. Die Besonderheit dieser drei Varianten ist, dass alle die Kombination der Mutationen Glu232Lys und Val269Met

trugen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die für die Bypass-Eigenschaften der 5P20-Variante verantwortlichen Mutationen Glu232Lys und Val269Met sind. Die weiteren zwei Mutationen, die in der 5P20-Variante vorhanden sind, scheinen diese Eigenschaft zumindest nicht zu hemmen.

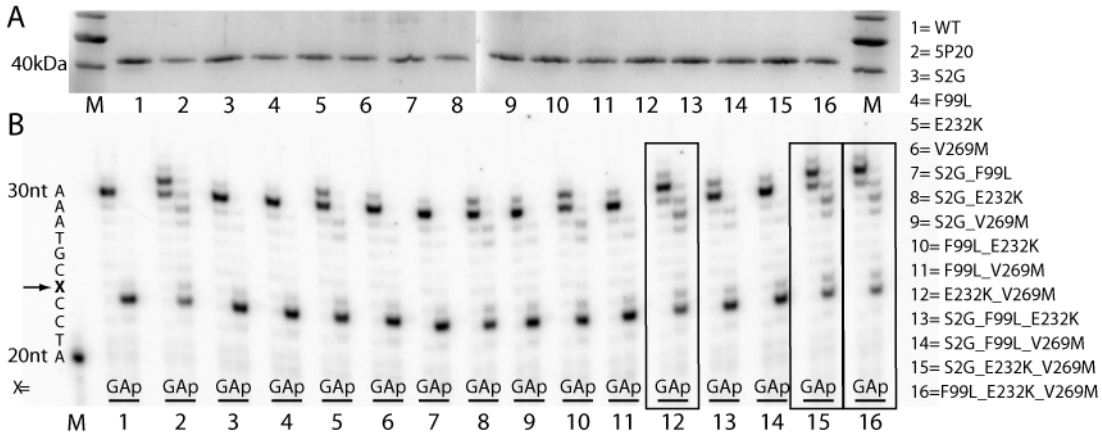


Abbildung 56: Analyse der einzelnen Mutationen der Variante 5P20. (A) Analyse der sechszehn verschiedenen Mutanten nach Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie. SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Bahn M: Marker. Bahn 1-16: verschiedene Mutanten siehe Abbildung. (B) Autoradiogramm der PAGE-Auftrennung von Primerverlängerungsreaktionen mit allen sechszehn möglichen Mutanten, die die Kombination der Mutationen in 5P20 darstellen. Die Reaktionen enthielten 150nM Primer/Templat-Komplex (Primer: F20TH, Templat: F33GCG (G) oder F33ApCG (Ap)), 500nM Polymerase und 200µM dNTPs. Die Reaktionen wurden 20min bei 37°C inkubiert. M: Primermarker. Bahn 1-16: verschiedene Mutanten siehe Abbildung. Experimentelle Details siehe 3.6.2. Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Mutanten, die die Mutation Glu232Lys enthielten, die Eigenschaft vorwiesen, eine zusätzliche Base nach dem Templatende anzuhängen (Abbildung 56, Variante 2, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16). Diese Aktivität wird Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase genannt. Diese Mutation scheint also nicht nur zu einer verbesserten Überlesefunktion zu dienen, sondern auch der Polβ diese Transferase-Aktivität zu verleihen.

2.2.4.9 Diskussion der Ergebnisse aus der Charakterisierung der Mutante 5P20

In diesem Teil der Arbeit wurde die Charakterisierung der Mutante 5P20 der Polβ vorgestellt, die aus dem beschriebenem Screening isoliert werden konnte (2.2.3). Diese Mutante wurde durch das verbesserte Überlesen von einer abasischen Stelle sowie durch die erniedrigte Selektivität entdeckt. Schon aus dem Lysat aus *E. coli* konnte bewiesen werden, dass die Bypass-Eigenschaften dieser Mutante ausgeprägter sind, als die des Wildtyp-Enzyms (2.2.3.6). Das Überlesen verschiedener DNA-Schäden wurde in einer radiometrischen Primerverlängerungsreaktion getestet, wobei das Templat eine Modifikation trug. Die Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde für beide Wildtyp und Mutante optimiert. Die Mutante 5P20 konnte bei niedrigeren Konzentrationen an Enzym einen verbesserten Bypass über oxidative Schäden zeigen, wobei bei höheren Konzentrationen auch der Wildtyp es konnte (2.2.4.4). Die Gegenwart einer abasischen Stelle im Templat stellte eine stärkere Blockade für die Polymerisationsreaktion des Wildtyps dar, weil dieses Enzym auch bei höheren Konzentrationen nicht effektiv darüber synthetisieren konnte. Die Mutante 5P20 erwies eine bessere Überlesefunktion auch bei niedrigeren Konzentrationen, wobei ein Volllängenprodukt nur bei höheren Konzentrationen an Enzym erreicht werden konnte (Abbildung 50).

Die Analyse der Sequenz dieser neuen Variante zeigte vier Mutationen auf der Proteinebene. Durch die Untersuchung aller möglichen Kombinationen dieser vier Mutationen konnte gezeigt werden, dass zwei dieser Mutationen, nämlich Glu232Lys und Val269Met, ausreichend für die Entstehung der neuen Eigenschaft sind und dass die weiteren beiden Mutationen Ser2Gly und Phe99Leu keinen negativen Einfluss darauf haben (2.2.4.8). Glu232 und Val269 befinden sich in der Nähe des Templatstranges in der Handfläche-Domäne bzw. in der sogenannten „hydrophoben Gelenkregion“ im Daumenbereich. Nur wenige Aminosäuren in der Polβ kommen in direktem Kontakt mit den Basen, darunter Lys234 und Tyr271. In der veröffentlichten Kristallstruktur von 1994 gehen Lys234 und Tyr271 Wasserstoffbrücken mit dem O2 eines Cytosins im Templat bzw. im Primer ein [38, 187]. Die wichtigen Mutationen,

die in 5P20 gefunden wurden, befinden sich beide in der Nähe dieser beiden Aminosäuren, die die Kontakte zu den Basen vermitteln.

Lys234 geht nicht nur eine Interaktion mit einer Templatbase ein, sondern weist ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung mit deren Phosphat-Rückgrat auf. In dieser Region werden Interaktionen zum DNA-Rückgrat zusätzlich durch zwei weitere Aminosäuren, nämlich Lys230 und Thr233, vermittelt. Die interagierenden Basen im Templat befinden sich in 3´-Richtung jeweils 4 oder 5 Nukleotide aufwärts des entstehenden Basenpaares. Die zwei Lysine 230 und 234 gehen die Wasserstoffbrücken durch den Stickstoff im Protein-Rückgrat und nicht durch den in der Seitenkette ein [38]. Das ist ungewöhnlich, weil andere DNA-Polymerasen, wie z.B. das Klenow Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I, eine Reihe von positiv geladenen Aminosäuren im DNA-Bindungskanal vorweisen, die stabilisierende Interaktionen mit der DNA durch die Seitenkette eingehen [38].

Die Aminosäuren Glutamat und Lysin unterscheiden sich nur leicht in der Größe, wobei die Seitenkette des Glutamats um ein C-Atom kürzer ist als die des Lysins. Dadurch ist das Van-der-Waals Volumen des Lysins etwas größer [188]. Der Austausch einer sauren anionischen gegen eine basische kationische Aminosäure bedeutet eine grundlegende Änderung der Natur der Seitenkette an dieser Position. Diese positive Ladung könnte in der Tat mit dem anionischen Zucker-Phosphat-Rückgrat des Templatstranges elektrostatische Wechselwirkungen eingehen, die vorher nicht vorhanden waren.

Wie in Abbildung 57 gezeigt, ist dieses Glutamat nicht hochgradig konserviert innerhalb der Familie X der DNA-Polymerasen. Nur die DNA-Polymerase λ (Polλ) weist ebenso ein Glutamat an dieser Position auf. Bei den DNA-Polymerase μ (Polμ) und der Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) ist zwischen β-Strang 3 und 4 ein Loop (Loop I) vorhanden, der bei den Polymerasen β und λ abwesend ist (Abbildung 57 und Abbildung 58).

Es wird vermutet, dass die Eigenschaft dieser beiden Polymerasen, Templat-unabhängige Synthese durchführen zu können, durch die Gegenwart dieses Loops kontrolliert wird (Abbildung 58) [189, 190]. Die Aminosäure Glu232, die in der

Mutante durch ein Lysin ersetzt ist, befindet sich an der Stelle des Loops I.

```
hPolβ   224   ITDTLSKGE-----------------TKFMG
hPolλ   461   LTDDLVSQEENGQQ------------QKYLG
hPolμ   364   ILYHQHQHSCCESPTRLAQQS-HMDAFERSFC
hTdT    379   LLYYDLVESTFEKLRLPSRKVDALDHFQKCFL
```

Abbildung 57: Alignment der Sequenzen der Polβ, DNA-Polymerase λ, DNA-Polymerase μ und TdT DNA-Polymerase. In Fett ist die Position der Mutation Glu232Lys gekennzeichnet. In blau markiert sind Lys230, Thr233 und 234, die bei der Polβ Kontakte zum Templat vorweisen. In Kursiv ist der Loop I bei Polμ und TdT dargestellt.

In der Tat, konnte man bei einer Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart der 5P20-Mutante und eines unbeschädigten Templates ein Volllängenprodukt beobachten, das um eine Base länger als das Templat war. Diese zusätzliche Base wurde vom WT nicht angehängt.

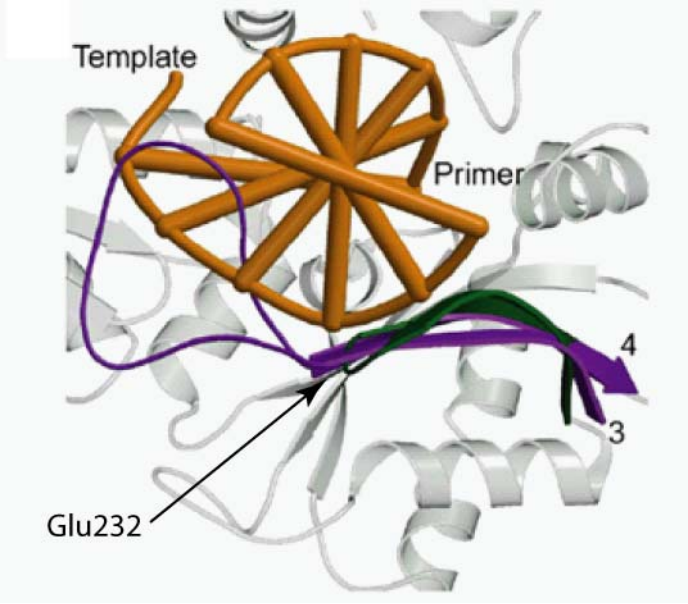


Abbildung 58: Vergleich von Loop I in verschiedenen DNA-Polymerasen. Die DNA ist orange, die β-Stränge 3 und 4 sind als Ribbon dargestellt. Polβ, grün (PDB: 2FMS); TdT, lila (PDB: 1JMS). Abbildung angepasst aus Referenz [9].

Die Analyse der Kombinationsmutanten (Abbildung 56) zeigte, dass alle Varianten, die die Mutation Glu232Lys trugen, eine zusätzliche Base zum Volllängenprodukt synthetisierten. Diese Eigenschaft wurde in der Gegenwart der Mutation Val269Met ausgeprägter. Diese neu erlangte TdT-Funktion der Polβ könnte eine Folge der

Mutation sein, die sich direkt in der Region befindet, in der sich der Loop I in Polμ und der TdT befindet, nämlich Glu232Lys.

Dass eine Mutation zu einer positiv geladenen Aminosäure eine wichtige Rolle in der Bypass-Aktivität haben kann, wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt. *Patel et al.* isolierten eine Variante der *Taq* DNA-Polymerase, nämlich Ile614Lys, die eine erhöhte Substratakzeptanz vorwies [168]. Ebenfalls wurde von *Glöckner et al.* eine Mutante der *KlenTaq* DNA-Polymerase gefunden, die durch den Austausch eines Methionins zu Lysin eine erhöhte Bypass-Aktivität über DNA-Schäden erzielte [134]. Diese beiden Mutanten wiesen eine Mutation einer apolaren Aminosäure zu einem Lysin auf, die sich in der Nähe des Templatstranges oder des aktiven Zentrums befand. Parallelen kann man zur Mutante 5P20 ziehen, die ebenfalls eine Mutation zu einem Lysin enthält, das in der Nähe zum Templatstrang liegt. Erhöhte elektrostatische Interaktionen mit der DNA könnte einer der Gründe sein, weswegen sie eine erhöhte Bypass-Aktivität vorweist.

Das könnte ebenfalls bei der *Dpo4* DNA-Polymerase der Fall sein, eine DNA-Polymerase mit Überlesefunktion, die eindeutig positive Ladungen im gesamten DNA-Bindungskanal vorweist (siehe Abbildung 59). Für diese DNA-Polymerase ist eine Kristallstruktur vorhanden, die in der Gegenwart von einer abasischen Stelle im Templat gelöst worden ist [89]. Auch an der Stelle, an der Polβ 5P20 die Mutation Glu232Lys trägt, und zwar in der Nähe vom Templatstrang ca. vier Basenpaare vom eintretendem dNTP abwärts, sind bei der *Dpo4* zwei basische Aminosäuren vorhanden, nämlich Arg242 und Lys243 (Abbildung 59). Diese Aminosäuren sind in Wasserstoffbrücken und Van der Waals Interaktionen mit der DNA involviert [51]. Die Region zwischen den Aminosäuren 234 und 243 ist die Verbindung zwischen Daumen und „kleine Finger"-Domäne („little finger") und interagiert mit dem Zucker-Phosphodiester-Rückgrat [77]. Die „kleinen Finger"-Domäne ist nur in DNA-Polymerasen der Y-Familie vorhanden und wechselwirkt mit der großen Furche der DNA [51]. Die *Dpo4* weist eine sehr starke Affinität zur DNA auf [191], die sehr ähnlich zu der von replikativen DNA-Polymerasen ist (z.B. T7 DNA-Polymerase: 23 ± 9 nM [183], humane DNA-Polymerase *γ*: 9,9 ± 2,1 nM [192], *E. coli* DNA-

Polymerase I: 5 nM [155]). Grund dafür ist vermutlich die Gegenwart der "kleinen Finger"-Domäne und die stark positiv geladene Verbindung zwischen „little finger" und Daumen, nämlich dem β-Faltblatt 9 [51, 191]. Tatsächlich umhüllen diese beiden Regionen die DNA wie eine Klemme. Es konnte außerdem bewiesen werden, dass die *Dpo4* in der Abwesenheit der „kleinen-Finger"-Domäne weniger prozessiv als der Wildtyp ist [51]. Postuliert wird die Theorie, dass diese DNA-Polymerase über ein weites und flexibles aktives Zentrum verfügt, um DNA-Schäden beherbergen zu können, aber auch dass das perfekte Fitting des Basenpaares nicht so kritisch zu sein scheint, wie das „Klemmen" der DNA-Doppelhelix, das die richtige Orientierung für die Katalyse ermöglicht („induced-grip") [193]. Dadurch kann vermutlich eine höhere Prozessivität erreicht werden.

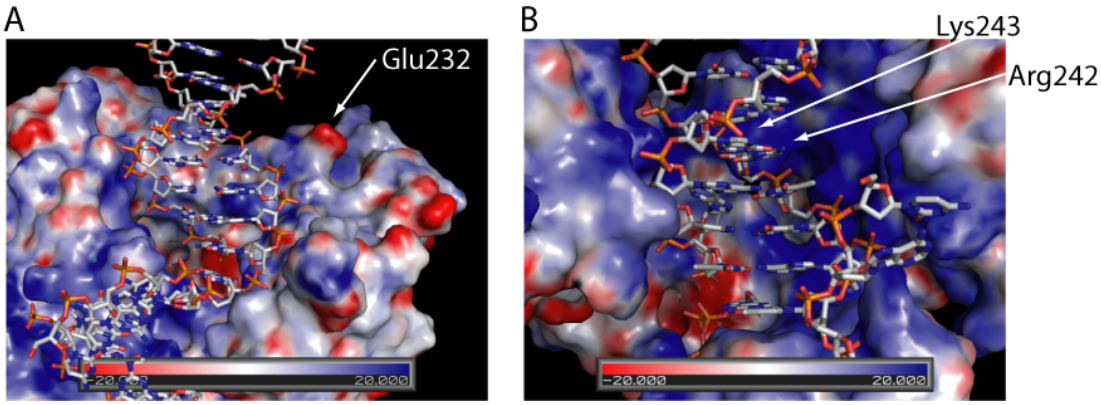


Abbildung 59: Conolly-Oberfläche mit farbiger Darstellung der elektrostatischen Ladung von Polβ und *Dpo4*. (A) Modell der Polβ nach PDB-Datei 2FMS. Die Aminosäure Glu232 ist gekennzeichnet. (B) Modell der *Dpo4* nach PDB-Datei 1N48. Die positiv-geladene Aminosäuren Arg242, Lys243 und Lys275 sind gekennzeichnet. Rote Einfärbung bedeutet negative Ladung. Blaue Einfärbung bedeutet positive Ladung. Erstellt mit der Software PyMol und APBStool (DeLano Scientific).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die elektrostatischen Interaktionen wichtig für die richtige Positionierung vom Primer/Templat-Komplex sind. Eine Parallele lässt sich zur Mutante 5P20 ziehen, die durch die Mutation Glu232Lys möglicherweise eine Veränderung der Interaktionen zwischen Protein und Templat erkennt.

Wichtig für die Bestätigung dieser Theorie ist die Lösung der Kristallstruktur der 5P20-Mutante in der Gegenwart einer abasischen Stelle. Dies wird zurzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Welte (Lehrstuhl für Biophysik und Strukturbiologie,

Universität Konstanz) bearbeitet.

Der Austausch einer zweiten Aminosäure in der Polβ, nämlich Val269Met, konnte zu verbesserten Bypass-Eigenschaften im Vergleich zur Einzelmutante Glu232Lys führen. Die Verbindung mit dieser zweiten Mutation konnte eine deutliche Verbesserung der Überlesefunktion beobachtet werden. Diese Position 269 war schon im ersten Screening aufgefallen, als die Mutante Val269Ile mit einer leicht verbesserten Bypass-Funktion isoliert wurde (siehe 2.2.2.6).

Viel ist über die sogenannten „hydrophoben Gelenkregion" („hydrophobic hinge region") der Polβ bekannt, in der sich Val269 befindet. Die Außenseite dieser Gelenkregion besteht aus Isoleucin174, Threonin196, Tyrosin265 und Valin269, während die Innenseite aus Leucin194, Isoleucin260, Phenylalanin272 und Tyrosin296 besteht. Diese Aminosäuren sind alle apolar und bilden stabilisierende hydrophobe Interaktionen untereinander. Diese Region übt eine Bewegung von 12 Å aus, wenn das Enzym von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht. Salzbrücken und Wasserstoffbrücken in dieser Region stabilisieren die offene oder die geschlossene Konformation [39].

Die Rolle von einigen Aminosäuren in dieser Gelenkregion wurde vor allem von *Sweasy* mithilfe von Mutationsanalysen intensiv untersucht. Die Mutante Ile260Met wurde in Zusammenhang mit Prostata-Krebs identifiziert [70]. Mutationen an dieser Position, die die Hydrophobizität dieser Aminosäure beeinträchtigen, wiesen eine sehr eingeschränkte Aktivität auf. Die einzigen Ausnahmen waren die Mutanten Ile260His und Ile260Gln, die einen Mutator-Phänotyp aufwiesen. Somit wurde gezeigt, dass die hydrophobe Natur dieser Aminosäure sowohl für die Aktivität als auch für die Genauigkeit dieses Enzyms wichtig ist. Der Grund dafür wurde als eine veränderte Positionierung der DNA interpretiert [194].

Das Tyrosins265 wurde ebenfalls intensiv untersucht. Diese Aminosäure befindet sich außerhalb des aktiven Zentrums und bildet keine direkten Kontakte mit der DNA. Die Mutante Tyr265His konnte in einem Randomscreening isoliert werden [195]. Diese Variante zeigte eine deutlich geringere Genauigkeit im Einbau von unkorrekten dNTPs

im Vergleich zum Wildtypenzym. Deswegen ist es naheliegend, dass diese Aminosäure eine große Rolle in der Selektivität dieses Enzyms besitzt. Es wird postuliert, dass Tyr265 in der Konformationsänderung involviert ist, die stattfindet, wenn das Enzym in die geschlossene Konformation übergeht, und wieder dass seine Hydrophobizität kritisch für die Genauigkeit der Polymerase wäre [196, 197].

Wie schon oben erwähnt, ist Tyr271 in eine Wasserstoffbrücke mit der 3´-Base vom Primer involviert. Diese Aminosäure bildet, zusammen mit Phe272 und Asp276, die Bindungstasche für das eintretende dNTP. Der Phenolring ist zwischen der 3´-Primerbase und dem eintretenden Nukleotid positioniert, und man geht davon aus, dass er zur sterischen Umgebung beitragen soll und organisierte Wasser-Cluster in der kleinen Furche der gebundenen DNA auflösen soll [38, 60]. Mutationen an der Position 271 verursachten eine leicht erniedrigte Selektivität im Vergleich zum Wildtyp [60].

Phe272 hingegen ist direkt in der Diskriminierung von Purin:Purin Fehlpaarungen involviert. Die Mutation zu Leucin vergrößert das aktive Zentrum, welches solche Fehlpaarungen erlaubt [170].

Diese gesamte Region ist innerhalb der DNA-Polymerasen der Familie X konserviert. Die höchste Ähnlichkeit weisen allerdings Polβ und Polλ untereinander auf. Beide diese Proteine tragen das YF-Motiv innerhalb der Gelenkregion (Tyr271 und Phe272 in Polβ, Abbildung 60). Die Polμ und die TdT enthalten auch zwei konservierte Aminosäuren, allerdings sind es Glycin und Tryptophan (GW-Motiv). Die Abwesenheit von Tyrosin und Phenylalanin bei diesen Enzymen ist vermutlich verantwortlich für die schlechtere Diskriminierung zwischen Desoxy- und Ribonukleotiden [198, 199].

Val269 ist nicht konserviert, jedoch ist bei den anderen Polymerasen ein Leucin vorhanden. Die apolare Natur der Seitenkette bleibt deswegen erhalten.

Die Mutation Valin269 zu Methionin bringt keine Änderung in der Ladung der Seitenkette mit sich, da beide Aminosäuren apolar sind. Methionin enthält allerdings ein Schwefelatom. Diese Aminosäuren unterscheiden sich sehr in der Größe, wobei das Methionin größer ist.

```
hPolβ   247    EKEYPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIF
hPolλ   581    GPGRRHRRLDIIVVPYSEFACAILYFTGSAHF
hPolμ   400    CPSWKAVRVDLVVAPVSQFPFAILGWTGSKLF
hTdT    425    GKTWKAIRVDLVLCPYERRAFAILGWTGSRQF
```

Abbildung 60: Alignment der Sequenzen der Polβ, DNA-Polymerase λ, DNA-Polymerase μ und TdT DNA-Polymerase. In Fett ist die Position der Mutation Val269Met gekennzeichnet, in blau bzw. rot das YF-Motiv der Polβ.

Wie schon beschrieben, wies die isolierte Variante aus der ersten Durchmusterung an der selben Stelle eine Mutation zu Isoleucin vor, wobei Isoleucin und Methionin genau dasselbe Van-der-Waals Volumen besitzen (2.2.2.6). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass diese Position eine wichtige Rolle in der Erkennung einer durch die abasische Stelle veränderten Konformation der DNA spielen kann. Die Tatsache, dass beide vorgefundenen Mutationen an dieser Stelle eine Vergrößerung ohne Änderung der Ladung der Seitenkette verursachten, könnte darauf hindeuten, dass die sterische Umgebung in dieses Erkennungsmechanismus eine große Rolle spielt („active site tightness“ vgl. 1.5). Die Veränderung von offener zur geschlossenen Konformation, die unter anderem durch die Bewegung dieser Region stattfindet, könnte durch die vorhandene Mutation beeinflusst sein und zu dieser veränderten Substratakzeptanz führen. Die Mutante könnte ebenfalls eine andere geschlossene Konformation einnehmen als der Wildtyp und eine veränderte Bindungstasche für das eintretende dNTP bilden. Eine gesättigte Mutagenese an dieser Stelle könnte einen Einblick in die Ursache dieser Funktion ermöglichen.

Wichtig zu betrachten ist allerdings die Tatsache, dass nur die Kooperation beider Mutationen tatsächlich die Überlesefunktion ausmacht. Die erhöhten elektrostatischen Wechselwirkungen und die Veränderung der sterischen Umgebung in der Gelenkregion scheinen eine wichtige und kooperative Rolle zu spielen.

Um diese Hypothesen festzulegen, wäre die Auflösung der Kristallstruktur dieser Mutante hilfreich. Deswegen wird zur Zeit dieses Experiment in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Welte (Lehrstuhl für Biophysik und Strukturbiologie, Universität Konstanz) bearbeitet.

Die biochemische Charakterisierung der Mutante 5P20 wurde im letzen Teil dieser

Arbeit vorgenommen. Durch EMSA-Versuche wurde festgestellt, dass die Mutante eine deutlich stärkere Interaktion mit dem Primer/Templat-Komplex als der WT eingeht. Diese Bindung wurde nicht durch die Gegenwart einer stabilen abasischen Stelle beeinflusst. In der Tat konnten beide Enzyme die beschädigte DNA genauso gut binden, wie die unbeschädigte (2.2.4.6). Die erhöhten elektrostatischen Wechselwirkungen, die womöglich durch die Mutation Glu232Lys entstehen, könnten diese stärkere Interaktion verursachen. Daraus kann ebenfalls abgeleitet werden, dass die erhöhte Bypass-Eigenschaft der 5P20-Variante nicht durch eine stärkere Wechselwirkung mit der beschädigten DNA im Vergleich zur unbeschädigten entstanden ist.

Die stärkere Interaktion zur DNA kann ebenfalls ein Grund für die erhöhte Steigerung der Prozessivität und der spezifischen Aktivität dieses Enzyms sein (Abbildung 54). In der Gegenwart einer Heparin-Falle, konnte die Mutante 3-fach mehr dNTPs als der WT einbauen, bevor sie von der DNA dissoziierte (Abbildung 54). Das Verhalten der Polymerase blieb allerdings distributiv, wie es für die Polβ in Abwesenheit von einem „downstream“ Primer im Fall einer „gapped DNA“ bekannt ist [186]. Die spezifische Aktivität wurde ebenfalls um das 3-fache erhöht (Abbildung 53). Man kann dadurch vermuten, dass die allgemein stärkere Interaktion mit dem Primer/Templat-Komplex, sowie die erhöhte spezifische Aktivität und Prozessivität, eine wichtige Rolle in der Überlesefunktion spielen können.

Aus den kinetischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Mutante 5P20 den kanonischen Einbau 25–fach besser als der Wildtyp durchführen konnte. Der größte Effekt war eindeutig bei der Affinität zum eintretenden dNTP zu erkennen. Diese erwies sich als 17–fach höher bei der 5P20-Mutante im Vergleich zum WT, während die Inkorporationsrate bloß um das 1,5-fache erhöht wurde (vgl.

Tabelle 9). Allerdings konnte eine leicht verringerte Genauigkeit in der Inkorporation eines nicht-kanonischen Nukleotids im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Wenn man die Effizienz des Fehleinbaus von einem dTTP im Vergleich zum kanonischen Einbau von dCTP gegenüber einem Guanosin betrachtet, wies die 5P20-Variante eine 3,5-fach schlechtere Genauigkeit auf, verglichen mit dem Wildtyp.

Beschriebene Mutanten der Gelenkregion wiesen ebenfalls deutlich niedrigere Einbaugenauigkeiten auf [170, 194, 197].

Der Einbau gegenüber einer stabilen abasischen Stelle konnte von der WT-Polymerase unter den gewählten Bedingungen nicht effektiv durchgeführt werden. dGTP konnte aus allen vier dNTPs am besten eingebaut werden. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37°C unter pre-steady-state Bedingungen, konnte der Umsatz der Reaktion nur zu 50% gesteigert werden und es wurde keine Sättigung erreicht. Dieser Umsatz erwies sich als nicht ausreichend, um die Kurven mit einer nicht-linearen Regression auszuwerten. Unter den getesteten Bedingungen konnte die 5P20-Mutante den Einbau gegenüber der abasischen Stelle eindeutig besser durchführen als der WT, wobei sie dGTP, dATP und dCTP einbauen konnte (vgl. Tabelle 10). Die Effizienz des Einbaus dieser dNTPs war untereinander vergleichbar. Bei einer genaueren Untersuchung der kinetischen Parameter konnte jedoch festgestellt werden, dass die Mechanismen der Inkorporation wohl unterschiedlich sind. Tatsächlich war die Affinität vom Enzym zu dGTP und dCTP entsprechend schwächer im Vergleich zum dATP (Tabelle 10). Der Einbau von dATP gegenüber der abasischen Stelle war allerdings viel langsamer, so dass die Gesamteffizienz ähnlich zu das vom dGTP und dCTP wurde. Diese Daten spiegeln das in den qualitativen Analysen beobachtete Verhalten wieder.

Da der Wildtyp gegenüber der abasischen Stelle am besten dGTP einbauen konnte, wurde ein Primer für die Untersuchung der Verlängerung nach der abasischen Stelle ausgewählt, der am 3´-Terminus ein Guanosin trug. Der Wildtyp konnte am besten dCTP einbauen, während die 5P20-Mutante sowohl dCTP als auch dGTP prozessieren konnte (Tabelle 11). Die Mutante 5P20 konnte den Einbau von dCTP 160-fach besser durchführen als der WT. Beide, Inkorporationsgeschwindigkeit und Affinität zum dNTP, wurden gesteigert. Die Einbaurate von dCTP nach der abasischen Stelle war vergleichbar mit der des kanonischen Einbaus von dCTP gegenüber G sowohl vom WT als auch von der Variante 5P20 (

Tabelle 9 und Tabelle 11). Die Affinität zum eintretenden dCTP erwies sich als 11-fach stärker für die Mutante als für den WT.

Die Ergebnisse aus den qualitativen Analysen wie aus den kinetischen Untersuchen

deuteten für beide Enzyme darauf hin, dass bei dem Bypass der abasischen Stelle möglicherweise ein -1-Frameshift entstand. Wie in Abbildung 51 gezeigt, synthetisierte die 5P20-Mutante in der Gegenwart einer abasischen Stelle im Templat ein Gemisch aus verschiedenen Produkten, wobei eine *n*-1, eine *n*, und eine *n*+1 Bande erschienen, wenn *n* die Länge des vollverlängerten Primers ist. Der Einbau von dGTP gegenüber der abasischen Stelle, der von beiden Enzymen auch wenn mit deutlich verschiedenen Effizienzen durchgeführt wurde, repräsentierte vermutlich den kanonischen Einbau gegenüber der ersten Base, die sich im Templat in 5´-Richtung befand, nämlich ein Cytosin. Dieses Verhalten wurde untersucht, indem die vier verschiedenen Basen abwärts der abasischen Stelle im Templat getestet wurden (Abbildung 52). In der Tat wurde meistens das dNTP eingebaut, das komplementär zur ersten Base abwärts im Templat war. Ganz eindeutig war es im Falle von einem Adenin, Guanosin und Thymin nach der abasischen Stelle. Dabei wurden dTTP, dCTP bzw. dATP am besten eingebaut. Wie schon aus der Literatur bekannt, baut die Polβ, anders als andere Polymerasen, kein dATP gegenüber einer abasischen Stelle ein („A-rule"), sondern die abasische Stelle wird aus der Doppelhelix geschoben und das eintretende dNTP kann mit der ersten Base abwärts paaren (Abbildung 61). Dieser Mechanismus wird „dNTP-stabilisiertes Misalignment" oder „5´-rule" genannt [179].

Beim Fall von Cytosin nach der abasischen Stelle wurden sowohl dGTP als auch dCTP eingebaut (Abbildung 52). Wenn man das Volllängenprodukt analysiert, sieht man dass es sich wieder um ein Gemisch von Produkten handelte, allerdings um eine Base kürzer als es bei den verwandten beschädigten Templaten der Fall war. Man kann daraus vermuten, dass teilweise dCTP eingebaut wurde, da es komplementär zur zweiten Base abwärts der abasischen Stelle war, und dadurch eine doppelte Deletion entstanden ist.

Dieses „dNTP- stabilisierte Misalignment" wurde konsolidiert, als die Verlängerung nach dem Einbau gegen die abasische Stelle stattfand. Am besten wurde dCTP eingebaut, obwohl die erste Templatbase nach der abasischen Stelle ein Cytosin war (Tabelle 11). Vermutlich paarte das Guanosin am 3`-Primerende mit diesem Cytosin und der kanonische Einbau von dCTP gegenüber dem nächsten Guanosin fand statt. Diese Untersuchung verdeutlichte, dass der Einfluss des Templatkontextes eine große

Rolle im Bypass-Mechanismus der Polβ spielt.

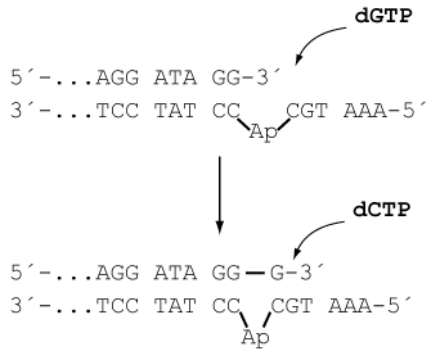


Abbildung 61: Schematische Darstellung des „dNTP-stabilisierten Misalignment".

Dieses Verhalten im Bypass einer abasischen Stelle ist für mehrere DNA-Polymerasen bekannt, wie z.B. die *Dpo4* DNA-Polymerase [89], die *Dbh* DNA-Polymerase [90] und die DNA-Polymerase IV aus *E. coli* [91] (siehe 1.4). Bei allen diesen Polymerasen findet bei der Replikation über eine abasische Stelle eine Leserasterverschiebung statt.

Verschiedene humane DNA-Polymerasen wurden bezüglich der Überlesefunktion von abasischen Stellen untersucht (siehe 1.4). Die Polι kann einen Bypass über verschiedene DNA-Schäden durchführen, wie z.B. 6-4-TT Photoprodukte und die abasische Stelle. Die Verlängerung nach dem Bypass wird vermutlich von der Polξ durchgeführt, die keine eigene Überlesefunktion besitzt. Die Polι kann gegenüber der abasischen Stelle alle vier dNTPs einbauen, allerdings kann dGTP am besten und Kontext-unabhängig prozessiert werden [81, 88]. Steady-state Untersuchungen haben bewiesen, dass die Polι dGTP gegenüber einer abasischen Stelle 2,7-fach schlechter als gegen die kanonische Base Cytosin einbauen konnte. Die kinetische Untersuchung der Verlängerung durch die Polξ wurde für die abasische Stelle nicht vorgenommen [82].

Die Rev1 DNA-Polymerase wurde ebenfalls analysiert. Aus steady-state Untersuchungen wurde gezeigt, dass Rev1 dCTP gegenüber einer abasischen Stelle 24-fach schlechter als gegenüber einem Guanosin einbauen kann, wobei jedoch keine Verlängerung stattfindet. Auch hier wird die Polξ für die Verlängerung verantwortlich gemacht [87].

Auch wenn der Vergleich zwischen kinetischen Daten aus steady-state und pre-steady-state Untersuchungen nicht optimal ist, kann man trotzdem die Überlesefunktion der Mutante 5P20 in Relation zu den oben genannten Beobachtungen setzen. Die 5P20-

Mutante konnte den Einbau gegen eine abasische Stelle ca. 3600-fach schlechter als den kanonischen Fall durchführen. Allerdings war die Verlängerung nur 20-fach schlechter als der kanonische Einbau.

Aus diesen Vergleichen wird klar, dass die isolierte Variante der 5P20 einen entscheidenden Vorteil gegenüber den anderen vorgestellten Fällen besitzt, nämlich die Möglichkeit, ein Nukleotid gegenüber der abasischen Stelle einbauen zu können und ebenfalls die Verlängerung davon zu ermöglichen. Diese Eigenschaft, die bei keiner humanen DNA-Polymerase so ausgeprägt ist, könnte einen Vorteil während der Replikation von beschädigter DNA verschaffen.

2.3 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Substratakzeptanz von DNA-Polymerasen untersucht. Zum einen wurden die sterischen Zwänge am aktiven Zentrum sowohl beim Einbau als auch bei der anschließenden Verlängerung mithilfe chemisch modifizierter Sonden untersucht. Schon in früheren Arbeiten von *Marx*, *Summerer* und *Strerath* wurde festgestellt, dass Nukleosidtriphosphate, die eine Modifikation an der 4'-C-Position der Desoxyriboseeinheit tragen, als Sonde eingesetzt werden können, um die Rigidität der aktiven Zentren von DNA-Polymerasen zu untersuchen. In dieser Studie wurden kinetische Untersuchungen der Polβ und des KF(exo-) durchgeführt, die deutliche Unterschiede in den sterischen Einschränkungen zeigen, die beim Zucker-Rückgrat des eingehenden Nukleotides und des 3'-Primerterminus wirken.

Beide Enzyme wurden durch die Modifikation am eintretenden Nukleotid beeinträchtigt, allerdings zeigte die Polβ einen stärkeren Effekt als das KF(exo-). In der Tat konnte die Polβ den $T^{Et}TP$ auch nach mehreren Stunden und bei hohen Konzentrationen nicht effizient einbauen. Das KF(exo-) konnte hingegen den Einbau modifizierter $T^{R}TPs$ nur geringfügig schlechter als das unmodifizierte $T^{H}TP$ durchführen. Da die Polβ eine ca. 10-fache geringere Genauigkeit in der Inkorporation von Nukleotiden im Vergleich zum KF(exo-) zeigt, würde man eine rigidere Bindungstasche beim KF(exo-) als bei der Polβ erwarten. Die Tatsache, dass das KF(exo-) die modifizierten Nukleotide besser einbauen konnte als die Polβ, weist auf eine größere Flexibilität im aktiven Zentrum hin, zumindest in der Interaktion mit dem Zucker.

Bei der Untersuchung der Interaktionen am 3´-Primerterminus konnten Unterschiede in der Verlängerungseffizienz der alkylierten Primer festgestellt werden, die um mehrere Größenordnungen variierten. Die beiden untersuchten Enzyme zeigen ein entgegengesetztes Verhalten, wenn sie die eingesetzten sterischen Sonden am Primerterminus im Vergleich zum eintretenden dNTP prozessieren. In der Tat konnte

die Polβ die Primer/Templat-Komplexe gut prozessieren, die am 3´-Primerterminus die Modifikation trugen. Die Enzymkonformation in der Polβ kann offensichtlich die Störung durch sterische Sonden besser tolerieren als die des KF(exo-).
Dieser Teil der Arbeit bietet die ersten experimentellen Hinweise, dass bei den untersuchten Polymerasen unterschiedliche sterische Zwänge auf den Nukleotiden am 3´-Primerterminus wirken. Diese Erkenntnisse stimmen den experimentellen Daten über die Unterschiede in „Misalignment Fidelity" zu. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die sterischen Zwänge direkt in der Genauigkeit von DNA-Polymerasen involviert sind. Eine interessante anschließende Untersuchung wäre, die Kristallstruktur der beiden Polymerasen in der Gegenwart dieser Sonden zu lösen, um die Unterschiede in den sterischen Zwängen besser klären zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Screeningsystem entwickelt, um eine Mutante der Polβ zu finden, die eine erhöhte Überlesefunktion über DNA-Schäden vorweist. Das Ziel dieser Evolution war, einen Beitrag zur Klärung des Mechanismus zu leisten, der an der Basis der Bypass-Fähigkeit mancher DNA-Polymerasen liegt. Als Startpunkt wurde das Screeningsystem von *Summerer* genommen, um es für eine humane mesophile DNA-Polymerase zu adaptieren. Das Screening basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffs SybrGreen I, das sich an doppelsträngige DNA bevorzugt anlagert. Der Endpunkt einer Primerverlängerungsreaktion konnte somit schnell und in einem Multilochformat ermittelt werden. Die Herausforderung dieser Methode stellte allerdings die Expression der Polβ-Mutanten in 96-Deepwellformat dar. Dieser Schritt hat sich als der entscheidende für das Gelingen des Screenings herausgestellt. Nur durch die Optimierung des für die Polβ codierenden Gens an den Kodon-Gebrauch der *E. coli* konnte eine hohe Überexpression in so einem Format erzielt werden, um das Lysat direkt in der Reaktion einsetzen zu können. Durch eine so hohe Expression konnte ein Verhältnis zwischen aktiven und inaktiven Mutanten von 3:1 erreicht werden, welches die Durchmusterung ermöglichte.
6688 Mutanten wurden auf Aktivität gescreent. 40% davon (2714) wurden ausgewählt und später in eine zweite Primerverlängerungsreaktion unter modifizierten Bedingungen

getestet. Zwei verschiedene Ansätze wurden vorgenommen, um eine Mutante zu finden, die DNA-Schäden überlesen konnte. Zum einen wurde ein Templat in der Reaktion eingesetzt, das eine stabile abasische Stelle enthielt. Zum anderen wurde eine Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart von nur drei dNTPs durchgeführt. Aus beiden Reaktionen konnten mehrere Treffer identifiziert werden. Allerdings wurde eine Mutante, die in beiden Screeningsysteme hervorgestochen war, für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

Das Überlesen verschiedener DNA-Schäden wurde in einer radiometrischen Primerverlängerungsreaktion getestet, wobei das Templat eine Modifikation trug. Die Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde für beide, Wildtyp und Mutante, optimiert. Die Mutante 5P20 konnte bei niedrigeren Konzentrationen an Enzym einen verbesserten Bypass über oxidative Schäden zeigen, wasder Wildtyp erst bei höheren Konzentrationen erreichte. Die Gegenwart einer abasischen Stelle im Templat stellte eine stärkere Blockade für die Polymerisationsreaktion des Wildtyps dar, weil dieses Enzym auch bei höheren Konzentrationen nicht effektiv darüber synthetisieren konnte. Die Mutante 5P20 erwies eine bessere Überlesefunktion auch bei niedrigeren Konzentrationen, wobei ein Volllängenprodukt nur bei höheren Konzentrationen an Enzym erreicht werden konnte. Aus den kinetischen Daten wurde ersichtlich, dass der Wildtyp den Einbau gegenüber der abasischen Stelle nicht effektiv durchführen konnte, während die Mutante 5P20 dGTP, CTP und dATP einbauen konnte. Die anschließende Verlängerung konnte von der Mutante 160-fach besser als der Wildtyp durchgeführt werden.

Die Analyse der Sequenz dieser neuen Variante zeigte vier Mutationen auf der Proteinebene. Durch die Untersuchung aller möglichen Kombinationen dieser vier Mutationen konnte gezeigt werden, dass zwei dieser Mutationen, nämlich Glu232Lys und Val269Met, ausreichend für die Entstehung der neuen Eigenschaft waren und dass die weiteren beiden Mutationen Ser2Gly und Phe99Leu keinen negativen Einfluss darauf hatten. Glu232 und Val269 befinden sich in der Nähe des Templatstranges in der Handfläche-Domäne bzw. in der sogenannten „hydrophoben Gelenkregion“ im Daumenbereich.

Die Position 269 befindet sich in der Region, die die Veränderung von offener zur geschlossenen Konformation hervorruft. Diese Bewegung könnte durch die vorhandene Mutation beeinflusst sein und zu dieser veränderten Substratakzeptanz führen. Auffallend ist die Tatsache, dass eine weitere Mutante mit erhöhter Bypass-Funktion, nämlich Val269Ile, ebenfalls in dieser Studie isoliert werden konnte. Beide vorgefundenen Mutationen an dieser Stelle verursachten eine Vergrößerung ohne Änderung der Ladung der Seitenkette. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Position eine wichtige Rolle in der Erkennung einer durch die abasische Stelle veränderten Konformation der DNA spielen kann. Die sterische Umgebung in diesem Erkennungsmechanismus spielt eine große Rolle.

Die Mutation Glu232Lys trägt eine starke Änderung der Ladung der Seitenkette in der Nähe zum Templatstrang. Eine erhöhte elektrostatische Interaktion mit der DNA kann vermutlich einer der Gründe für diese neue Eigenschaft sein. In der Tat verdeutlicht der Vergleich mit der *Dpo4* DNA-Polymerase, eine TLS-Polymerase, dass positive Ladungen im DNA-Bindungskanal durchaus einen Einfluss auf die Überlesefunktion haben können.

Um diese Theorie zu bestätigen, wäre es wichtig, die Kristallstruktur der 5P20 Mutante in der Gegenwart einer abasischen Stelle zu lösen. Diese Experimente sind geplant und werden gerade in der Arbeitsgruppe von Prof. Welte (Lehrstuhl für Biophysik und Strukturbiologie, Universität Konstanz) bearbeitet. Es wäre außerdem interessant, eine Mutation in der DNA-Bindedomäne der *Dpo4* hinzuzufügen, die eine negative Ladung, wie in der Polβ vorhanden, einbringt, um zu untersuchen, ob die Überlesefunktion beeinträchtigt wird. Allgemeiner betrachtet könnte man versuchen, die Theorie, dass elektrostatische Interaktionen an der Basis der Überlesefunktion liegen, anhand von weiteren Beispielen mit weiteren DNA-Polymerasen zu beweisen.

Besonders interessant wäre die Charakterisierung der 5P20 Mutante in der Zellkultur, um zu testen, ob die neue Überlesefunktion der Polβ ein Vorteil für die Zelle sein kann. Es ist bekannt, dass die Schäden, die durch DNA- Alkylierungsstoffe entstehen, normalerweise durch BER repariert werden. Die Expression dieser Mutante in MEFs Polβ-/- und anschließender Behandlung dieser Zellen mit Methylmethansulfonat

(MMS) könnte eine Antwort auf diese Frage liefern.

3 Methoden

3.1 Synthese Oligodesoxynukleotide

Alle Synthesen wurden mit einem ABI 392 RNA/DNA-Synthesizer unter Verwendung der jeweiligen Standardreagenzien durchgeführt. Nach Syntheseende wurde die Synthesesäule geöffnet, das Säulenmaterial entnommen und in einem Schraubdeckel-Eppendorfgefäß mit 32%-iger wässriger Ammoniaklösung gemischt. Nach 12h Inkubation bei 55°C wurde die Ammoniaklösung im Vakuum entfernt, der verbleibende Feststoff in einem 1:1 (v/v) Gemisch aus Wasser und PAGE Ladepuffer aufgenommen, geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand für die Reinigung mittels PAGE (siehe 3.2.2) verwendet.
Der Einbau einer 4'-C-Alkyl-thymidineinheit in einen Oligodesoxynukleotidstrang erfolgte 3´-terminal. Zur Inkorporation 4´-C-modifizierter Thymidinsonden in DNA als 3´-terminales Nukleotid wurde die entsprechend modifizierte CPG-Festphase in Synthesesäulen eingefüllt und eingesetzt. Der erste Kopplungsschritt wurde mit einer Kopplungszeit von 10min durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Moleküle aus enzymatischen Modifikationsschritten wurden mittels nicht- denaturierender Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Abhängig von der Fragmentlänge wurden Gele zwischen 0,8 und 1% (w/v) Agarosegehalt in TBE Puffer verwendet. Eingewogene Agarose wurde in 0,5 x TBE im Mikrowellenherd aufgekocht. Die Lösung wurde anschließend in die vorbereitete Gelkammer gegossen und die entsprechenden Kämme für die Geltaschen eingesetzt. DNA-Proben wurden mit einem 6 x -konzentrierten Ladepuffer gemischt, aufgetragen und mit einer Spannung von 6-

8V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard wurden FastRuler DNA Ladder, High Range von Fermentas (500bp –10 000bp) oder GeneRuler DNA Ladder Mix von Fermentas (100bp – 10 000bp) verwendet. Das Gel wurde anschließend zuerst in einer Färbelösung (Ethidiumbromid 0,5µg/ml in 0,5xTBE) 20min lang und dann in einer Entfärbelösung (0,5xTBE) 10min lang geschwenkt.

10x TBE-Laufpuffer

Reagenz	Konzentration
Tris	890mM
Borsäure	890mM
EDTA	20mM

Durch Ethidiumbromid-Interkalation wurde die fluoreszente DNA anschließend auf einem Geldokumentationsgerät visualisiert.

Agarose-Ladepuffer

Reagenz	Konzentration
Glycerin	50% (v/v)
Tris-HCl	50mM
EDTA pH 8,0	50mM
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

3.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

DNA–Oligonukleotide wurden zur Reinigung oder Analyse von enzymatischen Reaktionen durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden 12%-ige Polyacrylamidgele (in 1,5mm Dicke für präparative oder 0,4mm für analytische Gele) durch Mischung von Vorratslösungen A, B und C hergestellt. Zum Start der Polymerisation wurden APS und TEMED zugegeben. Die Gellösung wurde

anschließend zwischen zwei gereinigte und silanisierte Glasplatten (52cm max. Lauflänge) gegossen, die durch entsprechende Abstandhalter voneinander getrennt waren. Die Geltaschen wurden durch Einsetzen eines entsprechenden Kammes hergestellt.

Polyacrylamidgel

Reagenz		Menge
Vorratslösung A:	10xTBE in 8,3 M Harnstoff	10ml
Vorratslösung B:	2% N,N'-Methylenbisacrylamid und 25% Acrylamidlösung in 8.3 M Harnstoff	48ml
Vorratslösung C:	8,3 M Harnstoff	42ml
APS 10% (w/v)		800µl
TEMED		40µl
Endvolumen		100ml

Nach Polymerisation (60min) wurde das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt, 1x TBE als Laufpuffer eingefüllt und ein Vorlauf (bei 45°C und max. 120W bei 1600V für präparative und 2300V für analytische Gele) durchgeführt. Vor Auftragung der Proben wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Proben wurden vor dem Lauf mit Auftragspuffer versetzt, für 2min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Polyacrylamid-Ladepuffer

Reagenz	Konzentration
Formamid	80% (v/v)
H_2O	20% (v/v)
EDTA	20mM

Als Längenreferenz wurden die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von ca. 1600V bei präparativen und 2300V bei analytischen Gelen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Analyse entweder

auf Whatmanpapier übertragen, getrocknet und auf einen Phosphorimagerscreen exponiert oder, bei präparativen Gelen, nach Ausschneiden der relevanten Banden verworfen.

3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mittels des QIAquick Gel Extraktionskits. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde die zu isolierende DNA mittels eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Hier wurde die Agarosematrix durch Zugabe von Lösung QG bei 50°C unter Schütteln aufgelöst, woran sich eine Reinigung über eine Silikagelmembran anschloss. Die DNA wurde anschließend mit H_2O dest. oder EB-Puffer von der Säule eluiert.

3.2.4 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen

Die durch Elektrophorese aufgetrennte DNA wurde auf eine in Klarsichtfolie eingeschlagene Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und durch UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht. Die zu isolierenden Banden wurde mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und durch eine 5-ml Spritze zerkleinert. Zur Elution wurden die zerkleinerten Gelstücke in einem Eppendorf-Gefäß mit etwa einem Volumen Wasser versetzt und in einem Thermoschüttler bei 55°C über Nacht geschüttelt. Nach Filtration über mit silanisierter Glaswolle gestopfte Spritzen wurde die DNA durch Ethanolpräzipitation (s.u.) entsalzt.

3.2.5 Ethanolpräzipitation

DNA wurde zur Beseitigung von Salzen und anderen Verunreinigungen aus wässriger,

monovalente Kationen enthaltender Lösung mittels Ethanol ausgefällt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen 0,3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 3 Volumen Ethanol (-20°C, 100%) versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 20min bei –80°C, woraufhin 15 000rpm bei 4°C für 30min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit auf –20°C gekühltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene Pellet in Wasser aufgenommen und die Lösung durch einen 0,45µm Spinfilter von Schwebstoffen befreit.

3.2.6 Quantitative Nukleinsäure-Bestimmung

Purin- und Pyrimidinbasen absorbieren ultraviolette Strahlung der Wellenlängen 250–270nm. Das Absorptionsspektrum besitzt bei einer Wellenlänge von 260nm ein Maximum, bei welchem die Quantifizierung der Nukleinsäuren durchgeführt wurde. Nach dem *Lambert-Beerschen* Gesetz existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Extinktion und der Konzentration der DNA, dabei gelten für die verschiedenen Nukleinsäurearten folgende empirische Faktoren:

Eine OD_{260} von 1 entspricht 50mg/ml dsDNA.

Für einzelsträngige Oligonukleotide wurde eine sequenzabhängige Formel zur Berechnung des millimolaren Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\varepsilon[mM^{-1}cm^{-1}] = 15{,}2(A) + 12{,}01(G) + 8{,}4(T) + 7{,}05(C)$$

wobei A, G, C und T die in der Sequenz enthaltenen Nukleotide bezeichnen.

Die Konzentration der gemessenen Lösung ergibt sich dann aus:

$$c[mM] = OD_{260} / (\varepsilon[mM^{-1}cm^{-1}] * \ell[cm])$$

wobei ℓ die Länge der Küvette ist.

3.2.7 Entfernung von Proteinverunreinigungen

Die Entfernung von Proteinverunreinigungen aus DNA-haltigen Lösungen erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mittels des Reaction Cleanup Kits oder nach dem Protokoll der Firma Zymo Research mittels des Zymoclean DNA Clean & Concentrator-5 Kits. Die in der Lösung enthaltenen Proteine wurden durch Zugabe von der Lösung QRC (Qiagen) oder DNA Binding Buffer (Zymo Research) denaturiert und eine Reinigung über eine Silikagelmembran anschloss. Die DNA wurde anschließend mit H_2O dest. oder EB-Puffer von der Säule eluiert.

3.3 Enzymatische Reaktionen

3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht den gezielten Austausch, die gezielte Einführung, oder die Entfernung von Aminosäuren. Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Folgende Programmparameter wurden dabei verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	30s	95°C	
Primer-Annealing	60s	60°C	
Elongation	390s	68°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	
Anzahl an Zyklen:			20

Die Reaktionen hatten folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Endkonzentration
Pfu Turbo 10x Puffer	1x
dNTP Mix (äquimolar)	0,125mM je dNTP
5' Primer	200nM
3' Primer	200nM
DNA Templat (pET21b_hPolβ)	10 bis 50ng
Pfu Turbo DNA-Polymerase	0,05 U/µL

Die verwendeten Primer zur Herstellung der D256A-Mutante (siehe 2.2.2.2) waren (Primersequenzen siehe 5.1):

Natürliche Sequenz	5´ Primer	Polβ D256A for
	3´ Primer	Polβ D256A rev
Kodon-optimierte Sequenz	5´ Primer	Polβ codon-optimized D256A for
	3´ Primer	Polβ codon-optimized D256A rev

Die methylierte Matrizen-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1µl des Restriktionsenzyms *Dpn*I 1h bei 37°C abgebaut. Das erhaltene Produkt wurde schließlich in *E. coli* XL10-Gold transformiert. Zehn Einzelklone wurden gepickt und auf die Mutation untersucht.

3.3.2 Ungerichtete Mutagenese

Die ungerichtete Mutagenese Methode wird angewendet um den Austausch von Aminosäuren in Proteine zu erzielen, indem man Mutationen in einem Gen während einer PCR einführt. Mutationen werden zufällig durch die Anwendung von fehleranfälligen DNA-Polymerasen und/oder Reaktionsbedingungen eingeführt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von der Firma Stratagene und die fehleranfällige PCR (error

prone-PCR).

3.3.2.1 Mutazyme PCR

Mutazyme II DNA-Polymerase ist ein Gemisch von zwei fehleranfälligen DNA-Polymerasen—Mutazyme I DNA-Polymerase und eine *Taq* DNA-Polymerase Mutante, die eine erhöhte Häufigkeit von Fehleinbau und Fehlpaarungsverlängerung zeigt, verglichen zu dem Wildtyp-Enzym. Diese Mischung zweier Enzyme sollte ein balanciertes Fehlerspektrum erzielen. Die Mutationsrate kann durch die Templatmenge und die Anzahl an Amplifikationszyklen gesteuert werden.

Folgende Programmparameter wurden dabei verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	60s	95°C	
Primer-Annealing	60s	60°C	
Elongation	120s	72°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	
Anzahl an Zyklen:			30

Die Reaktionen hatten folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Endkonzentration
Mutazyme II 10 x Puffer	1x
dNTP Mix (äquimolar)	0,2mM je dNTP
5' Primer	200nM
3' Primer	200nM
DNA Templat (pET21b_hPolβ)	variabel
Mutazyme II DNA-Polymerase	0,05 U/µL
Endvolumen	50µl

Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein Aliquot (5µL) des Ansatzes entnommen, mit Agarose-Ladepuffer (2,5µL) versetzt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach beendeter Reaktion wurde die dsDNA gemäß 3.2.1 und 3.2.3 gereinigt.

Spezifische Parameter für die Reaktionen waren:

Templatmengen an Polβ-ORF (5 Ansätze)

Name der Bibliothek	**Pool1-100**	**Pool1-700**	**Pool1-1500**	**Pool1-2200**	**Pool1-3000**
Templatmenge	100ng	700ng	1500ng	2200ng	3000ng
Erwartete Mutationsrate (Mutationen/ kb)	9 -16	4,5 - 9	0 – 4,5	0 – 4,5	0 – 4,5

Die verwendeten Primer zur Herstellung des ungerichtet-mutierten Inserts (siehe 2.2.2.4.1) waren (Primersequenzen siehe 5.1):

Klonierung in pET21b	5´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis for
	3´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis rev

3.3.2.2 Fehleranfällige PCR (error prone-PCR)

Die ungerichtete Einführung von Mutationen in den DNA-Templaten erfolgte durch fehleranfällige PCR in Ansätzen zu jeweils 50µL in einem PCR-Thermocycler. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine sogenannte „proofreading"-Aktivität (3'-5'-Exonuclease-Aktivität) und ist daher nicht in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide aus dem neu synthetisierten DNA-Strang zu entfernen. Dadurch amplifiziert sie DNA-Sequenzen mit einer enzymspezifischen Fehlerrate. Desweiteren lässt sich die Fehlerrate der Polymerase unter anderem weiter durch die Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen des Reaktionspuffers und Veränderungen im Gleichgewicht der Nukleotide erhöhen.

Die Reaktionen hatten folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 8,3	10mM
KCl	50mM
$MgCl_2$	7mM
dCTP	1mM
dTTP	1mM
dATP	0,2mM
dGTP	0,2mM
5' Primer	200nM
3' Primer	200nM
DNA Templat (pET21b_hPolβ)	300pg/µl
$MnCl_2$	0,05mM
Taq DNA-Polymerase	0,05U/µL
Endvolumen	50µl

Folgende Programmparameter wurden dabei verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	60s	95°C	
Primer-Annealing	60s	60°C	
Elongation	150s	72°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	
Anzahl an Zyklen:			20

Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein Aliquot (5µL) des Ansatzes entnommen, mit Agarose-Ladepuffer (2,5µL) versetzt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach beendeter Reaktion wurde die dsDNA gemäß 3.2.1 und 3.2.3 gereinigt.

Die verwendeten Primer zur Herstellung des ungerichtet-mutierten Inserts (siehe

2.2.2.4.2) waren (Primersequenzen siehe 5.1):

Klonierung in pET21b	5´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis for
	3´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis rev
Klonierung in pGDR11	5´ Primer	Polβ pGDR11 Mutagenesis for
	3´ Primer	Polβ pGDR11 Mutagenesis rev

3.3.3 Kolonie-Polymerase-Ketten-Reaktion (Kolonie-PCR)

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, um Bakterien zu identifizieren, die nach Transformation das erwünschte rekombinante Plasmid tragen. Als Templat für die Amplifikation wurden die Bakterien, ohne vorherige Lyse, benutzt. Einzelne Kolonien wurden von der Agarplatte mittels einer Pipettenspitze gepickt, in 50µl H_2O dest. aufgenommen und 1µl direkt in der Reaktion als Templat angesetzt. Die PCR erfolgten in Ansätzen zu jeweils 50µL in einem PCR-Thermocycler.

Folgende Programmparameter wurden dabei verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	60s	95°C	
Primer-Annealing	60s	60°C	
Elongation	180s	72°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	
Anzahl an Zyklen:			30

Die Reaktionen hatten folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Endkonzentration
Taq 10 x Puffer	1x
$MgCl_2$	2mM
5' Primer	200nM
3' Primer	200nM
dNTP Mix (äquimolar)	0,2mM je dNTP
DNA Templat (Bakterien)	variabel
Taq DNA-Polymerase	0,05U/µL
Endvolumen	50µl

Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein Aliquot (5µL) des Ansatzes entnommen, mit Agarose-Ladepuffer (2,5µL) versetzt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach beendeter Reaktion wurde die dsDNA gemäß 3.2.1 und 3.2.3 gereinigt.

Die verwendeten Primer zur Kontrolle der Klonierung des random-mutierten ORFs (siehe 2.2.2.4) waren (Primersequenzen siehe 5.1):

Klonierung in pET21b	5´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis for
	3´ Primer	Polβ pET21b Mutagenesis rev
Klonierung in pGDR11	5´ Primer	Polβ pGDR11 Mutagenesis for
	3´ Primer	Polβ pGDR11 Mutagenesis rev

3.3.4 5'-Phosphorylierung mit ^{32}P

Zur radioaktiven 5´-Markierung von DNA-Primern wurden diese mit *T4* Polynukleotidkinase phosphoryliert. Dazu wurden die Oligonukleotide bei 37°C mit [γ-^{32}P]-ATP und *T4* PNK für 60min inkubiert.

Für die Phosphorylierung wurde folgender Ansatz angewandt:

Reagenz	Endkonzentration
T4 PNK Puffer	1x
DNA-Primer	0,2µM (10pmol)
[γ-^{32}P]-ATP	0,2µCi/µL
T4 Polynukleotidkinase (*T4* PNK)	0,5U/µL
Endvolumen	50µl

Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt und der markierte Primer durch Gelfiltration (Sephadex G-25) von Salzen und verbliebenem ATP befreit. Nach Zugabe von 20µl unmarkiertem Primer (10µM) wurden 70µl einer 3µM Lösung erhalten, die für DNA-Polymerase-Reaktionen eingesetzt wurde.

3.3.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Die Restriktion doppelsträngiger DNA diente der Herstellung kohäsiver Termini für die Klonierung von DNA-Stücken nach Ligation in einen Vektor. Durch die Verwendung zweier nicht isoschizomerer Restriktionsendonukleasen können Ort und Orientierung der Insertion des DNA-Stückes in den Vektor gesteuert werden („directional cloning“). Unit-Definitionen und Pufferbedingungen können den Protokollen des Herstellers entnommen werden. pET21b und hPolβ Pool1 und Pool2- Random-inserts wurden sequenziell zuerst mit *NheI* in NEB Puffer 2 und nach Anpassen vom Salzgehalt mit *NotI* für jeweils 3h bei 37°C verdaut. pGDR11 und hPolβ Pool3- Random-insert wurden mit *BamHI* und *SalI* in NEB Puffer 3 für 1h bei 37°C gleichzeitig verdaut. Die Reinigung des Inserts erfolgte über Agarose Gelelektrophorese und Elution aus dem Gel gemäß 3.2.1 und 3.2.3. Die Vektor-DNA wurde direkt nach dem Verdau an den 5´-Ende dephosphoryliert (siehe 3.3.6).

Die Restriktionsansätze für die Klonierung in den Vektor pET21b hatten folgende

Zusammensetzung:

Reagenz	Endkonzentration
10x NEB Reaktionspuffer 2	1x
BSA (NEB Stock)	1x
dsDNA	5-20fmol/µl
NheI	0,032U/fmol DNA
Endvolumen	50µl

Anschließend wurde der Salzgehalt angepasst und das zweite Enzym dazugegeben:

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	50mM
NotI	0,032U/fmol DNA
Endvolumen	70µl

Für die Klonierung in den Vektor pGDR11 wurde folgender Ansatz angewandt:

Reagenz	Endkonzentration
10x NEB Reaktionspuffer 3	1x
BSA (NEB Stock)	1x
dsDNA	5-20fmol/µl
SalI	0,064U/fmol DNA
BamHI	0,16U/fmol DNA
Endvolumen	50µl

3.3.6 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde die mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaute Vektor-DNA an den 5´-Enden durch eine einstündige Inkubation mit Antarctic Phosphatase (5U für 50µl-Ansatz) bei 37°C

dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde direkt dem Restriktionsverdausgemisch zugegeben, mit der Zugabe des für die Phosphatase eigenen Puffers. Durch eine nachfolgende 20-minütige Inkubation bei 65°C erfolgte die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase. Reinigung erfolgte über Agarose Gelelektrophorese und Elution aus dem Gel gemäß 3.2.1 und 3.2.3.

3.3.7 Ligation doppelsträngiger DNA

Durch Ligation von DNA-Stücken und Vektoren werden rekombinante Plasmide erzeugt, die anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert werden können. Dazu wurden Reaktionen linearisiertes Plasmid mit einem dreifachen Überschuss an verdautem hPolβ- Random-Insert (siehe 3.3.2) in Gegenwart der *T4* DNA-Ligase inkubiert. Die Reaktion wurde 16h bei 16°C im PCR Cycler (Deckeltemperatur 30°C) inkubiert.

Für die Reaktion wurde folgender Ansatz angewandt:

Reagenz	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer (+ATP)	1x
Insert DNA	1,45ng/µl
Vektor DNA	2,5ng/µl
T4 DNA Ligase	0,05U/µl
Endvolumen	20µl

Erhaltenen Reaktionsmischungen wurden aufgereinigt (siehe 3.2.7) direkt in *E. coli* XL10-Gold oder BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert (siehe 3.4.6). Es wurden stets Kontrollen ohne Insert durchgeführt, um die Effizienz der intramolekularen Ligation abzuschätzen.

3.3.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von GATC Biotech oder Sequiserve Sequencing Services durchgeführt. Zu analysierende Plasmide wurden dafür in *E. coli* XL10-Gold oder *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wie in 3.4.2 beschrieben vermehrt, mittels des Qiagen Miniprep Kits (siehe 3.4.4) gereinigt und verschickt.

3.4 Bakterienkulturen

3.4.1 Plattenkultur

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgt durch Ausstreichen von Flüssigkulturen oder Transformationsansätzen auf sterile LB-Agar-Platten. Zur Selektion auf Plasmide wurden dem Medium entsprechende Antibiotika (Carbenicillin Endkonzentration 100µg/mL, Chloramphenicol Endkonzentration 34µg/ml) zugesetzt. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

3.4.2 Flüssigkultur

Flüssigkultur erfolgte in sterilen Gefäßen bei 37°C im Schüttelinkubator. Für Sequenzierungsansätze wurden *E. coli* XL10-Gold LB-Kulturen (+Carbenicillin, 150µg/ml) oder *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL LB-Kulturen (+Carbenicillin, 150µg/ml und Chloramphenicol, 34µg/ml) von 5 oder 20ml über Nacht bei 220rpm durchgeführt. Für Expressionskulturen wurden Übernachtkulturen wie unter 3.5.1 beschrieben durchgeführt.

3.4.3 Glycerinkultur

Zum Anlegen von Glycerinkulturen für die Langzeitlagerung von *E. coli* Zellen wurde 1

Volumen Flüssigkultur vorsichtig mit einem Volumen Glycerin-Medium vermischt, 30min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.4.4 Plasmidisolierung

Nach Transformation von *E. coli* XL10-Gold oder *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL und Plattenkultur über Nacht wurden Einzelkolonien gepickt und in 5ml LB-Flüssigmedium (+ Carbenicillin 150µg/ml bei XL10-Gold; + Carbenicillin, 150µg/ml und Chloramphenicol, 34µg/ml bei BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) über Nacht kultiviert (37°C, 220rpm). Reinigung der Plasmide erfolgte nach Vorschrift des Qiagen Miniprep Kits: Nach Zellernte durch Zentrifugation (10min, 4°C, 4000rpm) wurde das erhaltene Pellet in RNAseH-haltigem Puffer P1 resuspendiert und zur DNA-denaturierenden Lyse mit alkalischem, SDS-haltigem Puffer P2 versetzt. Nach Neutralisation und Zugabe von chaotropen Salzen (Puffer N3) wurde zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen renaturierten Plasmide an die Silikagelmembran einer Zentrifugationssäule gebunden. Nach Waschen der Säule wurde diese im Vakuum getrocknet und die DNA mit Wasser eluiert.

3.4.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Es wurden 5ml Übernacht-Flüssigkultur (LB-Medium, 15µg/ml Tetracyclin) von vereinzelten Kolonien von *E. coli* XL10-Gold und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL hergestellt. Es wurde damit 1l Kultur (LB-Medium, 15µg/ml Tetracyclin) angeimpft und bei 20°C kultiviert, bis ein OD_{600} von 0,5 erreicht war. Die Kulturen wurden auf 0°C 15min gekühlt und bei 4°C durch Zentrifugation pelletiert (30min, 4000rpm). Anschließend wurden die Pellets in 5ml (4°C) H_2O resuspendiert und zweimal in je 1l (4°C) H_2O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 30min, 4000rpm) wurden die erhaltenen Pellets in 80ml 10% Glycerol (4°C) resuspendiert, noch einmal pelletiert

und in 8ml 10% Glycerol aufgenommen. 200µl-Aliquots wurden angesetzt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.6 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* XL10-Gold und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurden 1ng Vektor mit 100µl frisch aufgetauten elektrokompetenten Zellen vorsichtig bei 0°C gemischt. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation im Gene Pulser II (BioRad, München). Die Zellen wurden in eine 1mm-Elektroporationsküvette überführt und eine Spannung von 1800V wurde für 5ms angelegt. Nach Zugabe von 900µl warmem SOC-Medium und einstündiger Inkubation bei 37°C (350rpm, Eppendorfschüttler) wurden die Zellen auf Agarplatten (100µg/ml Carbenicillin bei *E. coli* XL10-Gold oder 100µg/ml Carbenicillin und Chloramphenicol 34µg/ml bei *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden stets Kontrolltransformationen ohne Vektor durchgeführt. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde 1µl des Ligationsansatzes (siehe 3.3.7) verwendet.

3.5 Expression und Reinigung von Polβ

3.5.1 Expression

Zur Expression von Polβ mithilfe des pET21b_hPolβ-Vektors wurde *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL als Expressionsstamm verwendet. Zur Expression von Polβ mithilfe des pGDR11_hPolβ_codon_optimized-Vektors wurde *E. coli* XL10-Gold als Expressionsstamm verwendet. Es wurden Übernachtkulturen von vereinzelten Kolonien hergestellt (LB, passende Antibiotika). Die Übernachtkulturen wurden 20- fach in frisches LB mit den entsprechenden Antibiotika verdünnt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 37°C inkubiert (OD_{600} = 0,6 – 0,7). Die Expression wurde durch

Zugabe von 1mM IPTG induziert, die Kulturen nach 4h weiterer Inkubation bei 37°C pelletiert und auf -80 °C gelagert. Zur Herstellung der Mutantenbibliothek von hPolβ wurden einzelne Klone in 150µl mit den entsprechenden Antibiotika versetztem LB-Medium in 384-Deepwellplatten mit Hilfe von sterilen Zahnstochern gepickt, bei 37°C und 1000rpm kultiviert und für die Lagerung bei -80°C mit Glycerol beschichtet (siehe 3.4.3). 1ml-Expressionskulturen der Einzelklone wurden in 2,2ml-96-Deepwellplatten durchgeführt. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters überimpft. Die Platten wurden zur Inkubation mit Airpore Tape Sheets verschlossen und bei 1000 rpm geschüttelt. Die Expression wurde ebenfalls bei OD_{600} = 0,6 – 0,7 mit 1mM IPTG induziert. Die Platten wurden nach 4-6h bei 4000 rpm abzentrifugiert und die Pellets wurden bei -80°C gelagert.

3.5.2 Native Lyse von Expressionskulturen

Zur Lyse der pelletierten Expressionskulturen wurden die Pellets in Ni-NTA-Bindepuffer resuspendiert, 0,1mg/ml Lysozym dazugegeben und 45min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mithilfe eines Ultraschallgeräts behandelt. Die lysierten Bakterien wurden hinterher 30min bei 20 000rpm und 4°C zentrifugiert. Für Ni-NTA Reinigungen wurden 50µl Bindepuffer pro ml Expressionskultur verwendet und der Überstand für die weitere Reinigung verwendet (siehe 3.5.3). Zur Herstellung der ersten Polβ- Mutantenbibliothek wurden die in 96-Deepwellplatten hergestellten 1ml-Kulturpellets (siehe 3.5.1) in 550µl Bindepuffer und 300µl Glaskugeln lysiert. Zur Herstellung der zweiten Polβ- Mutantenbibliothek wurden die in 96-Deepwellplatten hergestellten 1ml-Kulturpellets in 300µl Lysepuffer in der Gegenwart von 0,1mg/ml Lysozym resuspendiert und 45min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900µl Lagerpuffer dazugegeben und die Platten wurden 45min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert.

3.5.3 Proteinreinigung

Der Überstand der nativen Zelllyse (siehe 3.5.2) wurde mit Ni-NTA-Sepharose-Suspension versetzt (10µl pro ml Expressionskulturvolumen) und 1h bei 4°C geschüttelt. Die Suspension wurde 10min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte Ni-NTA-Sepharose wurde zweimal mit 50µl/ml Kulturvolumen Ni-NTA Waschpuffer gewaschen und daraufhin zweimal mit je 10µl Ni-NTA-Elutionspuffer/ml Kulturvolumen eluiert. Die erhaltene Lösung wurde über Ultrafiltration (10kDa Auschlussgröße) auf ca. ein Zwanzigstel des Volumens konzentriert, mit 2x Polβ-Lagerpuffer wieder auf das Ursprungsvolumen verdünnt und nochmals auf ein Zwanzigstel konzentriert. Dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt um das Imidazol auszuspülen. Andernfalls wurden die Elutionsfraktionen in 2x Polβ-Lagerpuffer (zweimal fünf Liter) dialysiert. Schließlich wurde ein Volumen Glycerol zugegeben. Die Einstellung der Proteinkonzentration nach Quantifizierung (siehe 3.5.7) wurde mit 1x Polβ-Lagerpuffer mit 50% Glycerin vorgenommen. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt und alle verwendeten Lösungen waren ebenfalls auf 4°C gekühlt.

Wenn das Enzym für die Messung kinetischer Parameter eingesetzt wurde, wurde die Reinigung des Enzyms nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie mit einer Ionentauscherchromatographie fortgesetzt. Dafür wurden eine FPLC-Apparatur (Biorad) und eine 1ml-HiTrap SP-HP Säule (GE Healthcare) verwendet. Die Elutionsfraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie wurden 1:10 im Ionentauscherpuffer A verdünnt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min auf die Säule binden lassen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradient von 0% bis 100% Ionentauscherpuffer B über 10ml eluiert. 250µl-Fraktionen wurden gesammelt, analysiert und die Enzym-enthaltene Fraktionen wurden gepoolt und dialysiert wie oben beschrieben.

Die Reinigung in 96-Well Format erfolgte wie oben beschrieben. Die Unterschiede sind hier beschildert. Die Ni-NTA Suspension wurde in 96-Well Filterplatten pipettiert,

equilibriert und anschließend wurden 400µl Lysat mithilfe vom Pipettierroboter dazugegeben. Die Bindung fand bei 4°C für 1h statt. Die Filterplatten wurden dann für 5sec bei 1000rpm zentrifugiert. Der Slurry wurde zweimal mit 400µl Ni-NTA-Waschpuffer gewaschen. 100µl Ni-NTA-Elutionspuffer wurden dazugegeben und 1h bei 4°C inkubiert. Die Eluaten wurden direkt in einer Reaktion getestet oder bei -20°C gelagert.

3.5.4 Glycin SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen erfolgte in denaturierenden SDS-PAGE-Gelen. Diese setzen sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient zur Fokussierung der Proteine, während diese im Trenngel nach ihrem spezifischen Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines Gels (7,5 x 6 cm) wurde zuerst das Trenngel aus den entsprechenden Vorratslösungen hergestellt, mit APS und TEMED versetzt und die Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Für die Polymerisation (ca. 60min) wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Glycin-SDS-Ladepuffer

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl pH 6,8	50mM
SDS	2% (w/v)
Glycerin	10% (v/v)
β-Mercaptoethanol	1% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

Etwa 20µL der jeweiligen Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und nach Denaturierung für 5min bei 95°C in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei

ca. 35mA.

Trenngel (12%)

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl pH 8,8	375mM
SDS	0,1% (w/v)
Acrylamidlösung 30% (37,5:1)	12% (w/v)
APS 10% (w/v)	0,5% (v/v)
TEMED	0,05% (v/v)

Sammelgel (4%)

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl pH 6,8	250mM
SDS	0,1% (w/v)
Acrylamidlösung 30% (37,5:1)	4% (w/v)
APS 10% (w/v)	0,5% (v/v)
TEMED	0,05% (v/v)

Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer 10x

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl	250mM
Glycin	2M
SDS	1% (w/v)
pH = 8,9	

3.5.5 Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen

Zum Einfärben wurden die Gele etwa 3-12h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und

anschließend in Entfärber-Lösung für ca. 30-60min wieder soweit entfärbt, bis ein ausreichender Kontrast erreicht war.

Coomassie-Lösung

Reagenz benötigt für 100mL	Menge
Methanol	20ml
Wasser	60ml
RotiBlue (Roth)	20ml

Entfärber-Lösung

Reagenz benötigt für 100mL	Menge
Methanol	20ml
Wasser	80ml

3.5.6 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen

Zur Silberfärbung wurden die Gele zum Fixieren für 10min in Lösung 1 in einer Glasschale geschwenkt. Zur Vernetzung wurde anschließend 10min in Lösung 2 geschwenkt. Nach Waschen der Gele für 20min wurde 10min mit Lösung 3 gefärbt und anschließend mit Lösung 4 für 10min entwickelt. Die Entwicklung wurde durch 5-minütiges Schwenken in 5%-iger Essigsäure gestoppt, die Gele daraufhin mit Wasser für 5min gewaschen und zuletzt in 10%-iger Glycerin für 5min imprägniert. Die Gele wurden anschließend auf Whatmanpapier übertragen, mit Folie abgedeckt und bei 80°C im Geltrockner getrocknet.

Lösung 1

Reagenz benötigt für 500mL	Menge
Ethanol	150mL
Essigsäure	50mL

Lösung 2

Reagenz benötigt für 500mL	Menge
Ethanol	150mL
Glutaraldehyd	2,5mL
Natriumthiosulfat	500mg
Natriumacetat	16,4g
Wasser	ad 500ml

Lösung 3

Reagenz benötigt für 500mL	Menge
Silbernitrat	500mg
Formaldehyd (36%)	125µL
Wasser	ad 500ml

Lösung 4

Reagenz benötigt für 500mL	Menge
Natriumcarbonat	12,5g
Formaldehyd (36%)	200µL
Wasser	ad 500ml

3.5.7 Proteinquantifizierung mit dem Bradford-Test

Nach Reinheitskontrolle der aufgereinigten Polβ bzw. der Mutanten durch SDS PAGE und Coomassie-Färbung wurden die erhaltenen Enzymmengen quantifiziert. Hierzu

wurde der Bradford Test verwendet. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der ungebundene (kationische), rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Absorptionsmaximum bei 595nm. Zur Quantifizierung wurde eine 1x Lösung des Farbstoffes in Verdünnungspuffer hergestellt und damit eine Verdünnungsreihe von BSA als Standard erstellt. Zu untersuchende Enzyme wurden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen in 1x Lösung verdünnt. Von allen Lösungen wurde 1ml in eine Küvette überführt. Nach 10min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die OD_{595} gemessen. Durch Erstellen einer Eichkurve der BSA-Standardlösungen konnten die unbekannten Enzymkonzentrationen ermittelt werden.

3.6 Aktivitätsuntersuchungen von DNA-Polymerasen

3.6.1 Primer-Verlängerungsreaktionen mit radiometrischer Produktanalyse

Templat- und 5´-^{32}P-markierte Primeroligodesoxynukleotide (Herstellung siehe 3.1) wurden im Verhältnis 1,5: 1 oder 5:1 im entsprechenden 1x Reaktionspuffer 5min bei 95°C denaturiert und anschließend 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die DNA-Polymerase zugegeben, die Reaktionsmischung 2min auf 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von dNTPs in 1x Reaktionspuffer gestartet. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurde durch Zugabe von PAGE-Ladepuffer gestoppt und das Produktgemisch durch PAGE analysiert (siehe 3.2.2). Reaktionszeiten, Primer/Templat-, dNTP-Zusammensetzung und -Konzentration sowie Polymerase-Konzentration sind in den Abbildungslegenden der jeweiligen PAGE-Gele angegeben.

Primerverlängerungsreaktion mit Polβ oder KF(exo-)

Reagenz	Endkonzentration
5´-^{32}P-Primer	40nM bzw. 150nM
Templat	500nM bzw. 225nM
10x Reaktionspuffer	1x
[Mn^{2+}- oder Mg^{2+}-Puffer für Polβ]	
[KF(exo-)-Reaktionspuffer für KF(exo-)]	
dNTPs	unterschiedlich
Polβ oder KF(exo-)	unterschiedlich
Endvolumen	20µl

3.6.2 Screening einer Mutantenbibliothek von Polβ

Alle Screeningreaktionen wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters durchgeführt. Es wurden jeweils 15µl Reaktionsmischung in auf 37°C beheizten, schwarzen 384-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt, und anschließend 5µl von auf 4°C gekühlter Eluat- oder Lysatlösung (siehe 3.5.2 und 3.5.3) aus 96-Well-Mikrotiterplatten dazu pipettiert. Die vorgelegte Reaktionsmischung enthielt dabei alle für eine Reaktion essentiellen Bestandteile bis auf die DNA-Polymerase. Nach einer Reaktionszeit von 30min wurden 45µl einer nicht DNA-denaturierenden Stopplösung zugegeben. Diese enthielt SybrGreen I, einen Farbstoff, der in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet und dabei eine Fluoreszenzverstärkung bei 485nm Anregung und 520nm Emission erfährt. Er konnte deshalb zur Endpunktquantifizierung der durch die Reaktion gebildeten dsDNA herangezogen werden. Die pipettierten Platten wurden anschließend im Fluoreszenzreader mit einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Detektionswellenlänge von 520nm ausgelesen. Jede der verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatten enthielt in einem Well Polβ- Wildtyp und in einem zweiten Polβ-D256A jeweils als interne Positiv- und Negativkontrolle.

Screeningreaktion

Reagenz	Endkonzentration
Primer (20mer, F20TH oder F20thioAG)	225nM
Templat (90mer, F90A oder F90Ap)	150nM
10x Reaktionspuffer (Mn^{2+}- oder Mg^{2+}-Puffer)	1 x
dNTPs	200µM
Eluat oder Lysat	0,25% (v/v)
Endvolumen	20µl

Diese Kulturen wurden in allen Schritten der Expression, Lyse und Lagerung exakt wie die Mutantenkulturen behandelt. Der Reaktionspuffer, der benutzt wurde, um die Aktivität der Mutanten zu testen, enthielt Mn^{2+} als divalenter Kation [174]. Die Tests der Bypass-Fähigkeit einer abasischer Stelle wurden in der Gegenwart von Mg^{2+} durchgeführt (Zusammensetzungen siehe 4.6).

Stopplösung

Reagenz	Endkonzentration
Tris-HCl	50mM
EDTA	10mM
SybrGreen I	4 x
pH = 7,5	

Zum Screening auf Bypass einer abasischen Stelle der getesteten Mutanten wurden parallel mehrere Reaktionstypen vergleichend durchgeführt. Die entsprechenden Zusammensetzungen von Primer/Templat-Komplexen und dNTP sind in 5.1 aufgeführt. Zur Auswertung der erhaltenen Rohwerte in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten wurden folgende Korrekturen mit Microsoft Excel vorgenommen:

- Um Schwankungen der SybrGreen I – Fluoreszenz zwischen verschiedenen Platten zu korrigieren, wurden bei allen Werten einer Platte der Wert der Negativkontrolle als

Background abgezogen. Die somit erhaltenen Werte wurden dann durch den höchsten gemessenen Wert auf dieser Platte geteilt. Auf jeder Platte befanden sich dabei mindestens acht Positivkontrolle mit Polβ-Wildtyp und nicht modifiziertem Primer/Templat-Komplex und acht Negativkontrolle mit Polβ-D256A und nicht modifiziertem Primer/Templat-Komplex.

- Werte einer Platte, die einen frei wählbaren Fluoreszenzwert unterschritten, der 60% der Positivkontrolle nach den obengenannten Korrekturen betrug, wurden als Reaktionen einer zu wenig aktiven Mutante betrachtet und nicht weiter berücksichtigt.

3.6.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Polβ

Radiometrische Primerverlängerungsreaktionen wurden in der Gegenwart von 150nM F23 und 195nM F33GCG, 200µM dNTPs und zwanzig verschiedenen Konzentrationen an DNA-Polymerase in 1x Polβ Mg^{2+}-Puffer wie beschrieben in 3.6.1 durchgeführt (Oligonukleotidsequenzen siehe 5.1). Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen gestoppt, 5min bei 95°C denaturiert und durch PAGE aufgetrennt (3.2.2). Die Intensität jeder Bande einer Bahn wurde auf die tatsächliche Menge an eingebauten dNTPs umgerechnet und addiert:

$$\text{Eingebaute dNTPs} = \sum_{P=1}^{n} (\text{Intensität Bande*Umrechnungsfaktor P*eingesetzte Menge an Primer})$$

wobei n die Anzahl an dNTPs ist, die in der entsprechenden Bande eingebaut wurden. Die Menge an eingebauten dNTPs für eine Bahn wurde durch die entsprechende Enzymmenge und Reaktionszeit geteilt. Der erhaltene Umsatz wurde anschließend gegen die entsprechende Enzymmenge aufgetragen und mit einer linearen Gleichung ausgewertet (GraphPad 4). Die Steigung dieser Gerade stellt die spezifische Aktivität dar.

3.6.4 Untersuchung der Prozessivität der Polβ

Die Prozessivität einer DNA-Polymerase beschreibt die Menge an dNTPs, die vom Enzym eingebaut werden, bevor es von dem Primer/Templat-Komplex dissoziiert. Um diese Eigenschaft zu untersuchen wurde eine radiometrische Primerverlängerungsreaktion in der Gegenwart einer Falle durchgeführt (3.6.1). Die Falle sollte die DNA-Polymerase nach der Dissoziation besetzen, sodass sie nicht wieder an einen Primer/Templat-Komplex binden und weiter synthetisieren konnte. Als Falle wurde Heparin verwendet, das stark negativ geladen ist und deswegen als Bindepartner dienen kann. Verschiedene Endkonzentrationen an Heparin (zwischen 1mg/ml und 40mg/ml) wurden getestet und bei allen konnte die Falle die DNA-Polymerase blockieren. Als Primer wurde F23 benutzt, während als Templat F90A (5.1). 20nM Polβ und 10nM Primer/Templat-Komplex wurden eingesetzt. Die Zugabe von 200µM dNTPs mit oder ohne 1mg/ml Heparin startete die Reaktion. Die Reaktionen wurden 10min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden gestoppt und auf ein 12%-iges denaturierendes PAGE aufgetragen.

3.6.5 Untersuchung der Affinität der DNA-Polymerase zum Primer/Templat-Komplex mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Dissoziationskonstante von der Polβ vom Primer/Templat-Komplex wurde gemessen [126]. Der radioaktiv markierte Primer F23 wurde an verschiedene Template (F33GCG oder F33ApCG) in 1,3-fachem Überschuss an Templat zu einer Endkonzentration von 1µM wie beschrieben in 3.6.1 annealt. Dieser Komplex wurde dann zu einer Konzentration von 0,1nM in Binding-Puffer verdünnt (4.6). Verschiedene Mengen an Polβ zwischen 0,25nM und 5µM wurden dazugegeben. Die Mischung wurde für 10min bei 20°C inkubiert. Die Analyse erfolgte über ein 8%-iges nicht-denaturierendes PAGE.

10x TBE Mg-Laufpuffer

Reagenz	Konzentration
Tris	500mM
Borsäure	500mM
EDTA	1mM
$MgCl_2$	20mM

8%-ige Gele (12cm Länge und 1,5 mm Dicke) wurden zwischen zwei gereinigten Glasplatten gegossen. Die Proben wurden bei 300V aufgetragen und die Elektrophorese erfolgte bei 150V für 1,5h bei 4°C. Das Gel wurde anschließend in 10%-ige Essigsäure fixiert und getrocknet.

Natives Polyacrylamidgel

Reagenz	Menge
10x TBE Mg-Puffer	10ml
Acrylamid 40% (29:1)	20ml
H2O	70ml
APS 10% (w/v)	800µl
TEMED	40µl
Endvolumen	100ml

Die gebundene Fraktion wurde mittels Standard-Phosphorimaging-Methoden ermittelt. Dieser Wert wurde anschließend gegen die Enzymkonzentration aufgetragen.
Die Kurve wurde mit der Gleichung ausgewertet:

$$Y=Bmax*X/(K_d+X)+c$$

wobei X die Enzymkonzentration, Y die Fraktion von gebundener Polymerase und K_d die Dissoziationskonstante sind.

3.6.6 Pre-steady-state kinetische Untersuchung

Um die Effizienz einer Reaktion zu untersuchen wurden pre-steady-state Kinetiken gemessen. Diese Methode besteht darin, die Geschwindigkeit der Reaktion und die Affinität der DNA-Polymerase zu messen, bevor ein steady-state Gleichgewicht entsteht. Dafür wurde ein Rapid-Quench-Flow Apparatus (RQF-3, KinTek) verwendet, das kurze Reaktionszeiten ab 2ms ermöglicht. Enzym und Primer/Templat-Komplex sowie das passende dNTP wurden in 1x Reaktionspuffer verdünnt.

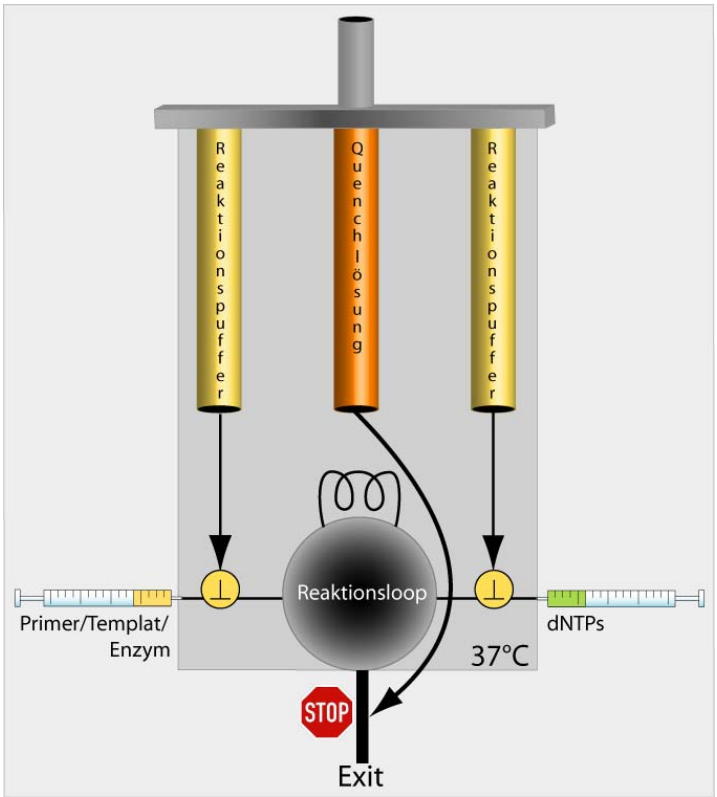


Abbildung 62: Graphische Darstellung eines Quench-Flow-Apparatus. Die Reaktanten treffen sich im Reaktionsloop. Nach der gewählten Zeit wird die Reaktion durch die Quench-Lösung gestoppt. Die Kammer ist bei der gewünschten Temperatur thermostatiert.

Wie in Abbildung 62 dargestellt, wurden jeweils 15µl von diesen beiden Lösungen in die Probeschleifen des Geräts mithilfe von 1ml-Spritzen eingefüllt. Durch die Bewegung der Platte an der Oberkante des Geräts wurden die zwei Reaktanten zusammengemischt und die Reaktion konnte gestartet werden. Die Reaktion fand im Reaktionsloop statt. Die Temperatur wurde mithilfe von einem Wasserbad konstant gehalten. Die

Reaktionszeit wurde durch die Länge des Schlauchs im Reaktionsloop sowie durch die Fließgeschwindigkeit automatisch gesteuert. Nach der gewählten Zeit traf die Reaktionslösung auf die Quenchlösung (0,6% Trifluoressigsäure) und somit wurde die Reaktion gestoppt. Typische Konzentrationen waren 100nM Primer/Templat-Komplex, 1µM Polβ und 200nM KF(exo-). Zeitreihen mit verschiedenen dNTP-Konzentrationen (zwischen fünf und sieben verschiedenen Konzentrationen) wurden gemessen. Die Zeitreihen bestanden aus sechs bis zehn Zeitpunkte. Alle Daten stammen aus Doppelbestimmungen. Die Produkte wurden mithilfe von einer denaturierenden PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Standard-Phosphorimaging-Methoden analysiert. Der Anteil an verlängertem Primer wurde mit der Biorad Quantity One Software bestimmt. Die aus den Zeitreihen erhaltenen Daten wurden gegen die entsprechende Reaktionszeit aufgetragen und mit einer einfach exponentiellen Gleichung gefittet (GraphPad 4):

$$Y=Ymax*(1-\exp(k_{obs}*X))$$

wobei X die Zeit und Y der Umsatz sind.
Die daraus erhaltene Umsatzraten k_{obs} wurden dann gegen die dNTP-Konzentration aufgetragen und mit einer hyperbolischen Gleichung ausgewertet (Gleichung 2):

$$Y=k_{pol}*X/(K_d+X)$$

wobei X die dNTP-Konzentration, Y die k_{obs}, k_{pol} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_d die Dissoziationskonstante vom dNTP zum Primer/Templat/Enzym-Komplex sind.

4 Materialien

4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, von „p.a.“ Qualität oder „für die Molekularbiologie“. Wasser wurde aus einer UV/UF-Reinstwasseranlage bezogen.

1,4-Dithiothreitol	Roth
Acrylamide	Roth
Agar	Roth
Agarose	GibcoBRL
Ammoniaklösung (32%)	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Aprotinin	Fluka
β-Mercaptoethanol	Roth
Borsäure	Riedel de Haën
Bromphenolblau	Fluka
Carbenicillin-Na-Salz	Roth
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Riedel de Haën
Complete, EDTA-free protease inhibitor	Roche
Coomassie Brillant Blau G 250	Roth
Dichlordimethylsilan	Sigma
Dimethylsulfoxid	Fluka
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethanol (100%)	Riedel de Haën
Ethidiumbromid (0,1%)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth

Formamid	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Sigma
Imidazol	Fluka
i-Propanol	Riedel de Haën
Isopropyl-b-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
LB Medium	Roth
Leupeptin	Fluka
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	ICN Biomedicals
N,N,N‘,N‘-Tetramethylenethylendiamin	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat*H2O	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natriumphosphat	Sigma
Ni-NTA-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
PMSF	Roth
Reagenzien für die Oligonunkleotidsynthese	
Standard DNA-Synthese	Applied Biosystems
Salzsäure (37%)	Merck
Sephadex G50	Amersham Pharmacia Biotech
SybrGreen I	Molecular Probes, Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma

Trypton	Sigma
Xylencyanol	Merck

4.2 Nukleotide und Radiochemikalien

dNTPs	Fermentas, Roche
[γ-^{32}P]-ATP	Hartmann Analytics

4.3 Standards und Kits

FastRuler DNA Ladder, High Range	Fermentas
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Zymoclean DNA Extraction kit	Zymo Research
Zymoclean DNA Clean & Concentrator kit	Zymo Research
MiniPrep Extraction Kit	Qiagen
Bradford Protein Quantifizierungskit	Roth
PageRuler Protein Marker	Fermentas

4.4 Enzyme und Proteine

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
*Nhe*I	New England Biolabs
*Not*I	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas
Taq DNA-Polymerase	Fermentas
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene

4.5 Plasmide und Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
XL10-Gold	Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F′ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Plasmidlagerung, Plasmidvermehrung	Stratagene
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL strain	E. coli B F– ompT hsdS(rB– mB–) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Expression von Polβ	Stratagene

4.6 Medien und Puffer

Medium oder Puffer	Bestandteile
LB-Medium pH 7,0	fertiges LB-Broth 2% (w/v)
LB Agar pH 7,0	fertiges LB-Broth 2% (w/v) + Agar 2% (w/v)
Polβ – Lagerpuffer	Tris-HCl (pH = 8) 20mM NaCl 100mM DTT 1mM EDTA 1mM Glycerol 50% (v/v)

Medium oder Puffer	Bestandteile
Ni-NTA Bindepuffer	Tris-HCl (pH = 7,9) 20mM NaCl 300mM Imidazol 5mM Benzamidin 1mM Leupeptin 1µg/ml Aprotinin 1µg/ml
Ni-NTA Waschpuffer	Tris-HCl (pH = 7,9) 20mM NaCl 300mM Imidazol 20 bis 50mM Benzamidin 1mM Leupeptin1µg/ml Aprotinin 1µg/ml
Ni-NTA Elutionspuffer	Tris-HCl (pH = 7,9) 20mM NaCl 300mM Imidazol 100 bis 200mM Benzamidin 1mM Leupeptin1µg/ml Aprotinin 1µg/ml Glycerol 30% (v/v) (nur für 96-Well-Format)
Ionentauscherpuffer A	Tris-HCl (pH = 7,9) 20mM KCl 25mM Glycerol 20% (v/v) NP-40 0,05% (v/v) DTT 1mM

Medium oder Puffer	Bestandteile
Ionentauscherpuffer B	Tris-HCl (pH = 7,9) 20mM KCl 1M Glycerol 20% (v/v) NP-40 0,05% (v/v) DTT 1mM
Lysepuffer	Tris-HCl (pH = 8) 50mM NaCl 300mM Lysozym 0,1mg/ml
Lagerpuffer	Tris-HCl (pH = 8) 20mM NaCl 100mM DTT 1mM EDTA 0,1mM Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
Polβ – Mn^{2+}-Reaktionspuffer	Tris-HCl (pH = 7,8) 50mM KCl 70mM DTT 1mM BSA 100µg/ml Glycerol 5% (v/v)
Polβ – Mg^{2+}-Reaktionspuffer	Tris-HCl (pH = 8) 50mM NaCl 20mM KCl 20mM $MgCl_2$ 10mM DTT 2mM BSA 200µg/ml Glycerol 1% (v/v)

Medium oder Puffer	Bestandteile
KF(exo-)-Reaktionspuffer	Tris-HCl (pH = 7,5) 10mM $MgCl_2$ 6mM DTT 2mM
Bindungspuffer	Tris-HCl (pH = 7,5) 10mM $MgCl_2$ 6mM NaCl 100mM Glycerol 10% (v/v) NP-40 0,5% (v/v)

4.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide (ON) wurden (wenn nicht wie in 3.1 beschrieben selbst synthetisiert) bei MWG-Biotech oder IBA GmbH bestellt. Chemisch modifizierte ON oder Primer wurden stets mittels PAGE gereinigt und durch Ethanolfällung (3.2.5) entsalzt. Als Templat dienende, unmodifizierte oder einer abasischer Stelle enthaltende ON wurden in 2x HPLC-Reinheit bestellt und nicht weiter gereinigt.

4.8 Verbrauchsmaterial

2,2ml 96-Deepwellplatten	Peske
384-Well-Mikrotiterplatten	Peske
96-Well-Filterplatten	ABGene
Airpore Tape sheets	ABGene
Aluminium PCR Folienaufkleber	ABGene
ClearFolien	ABGene
Dünnschichtchromatographieplatten	Merck

Einwegspritzen	Braun
Glaswolle (silanisiert)	Serva
Kanülen	Braun
Petrischalen	Roth
Reaktionsgefäße (1,5ml u. 2,0ml)	Peske
Reaktionsgefäße (PCR 200µl)	ABGene
Skalpelle	Roth
Spinfilter (0,45µM, Durapor membrane)	Roth
Spitzen für Hamilton Mikrolab Star	Hamilton Robotics
Spitzen für Mikropipetten	Peske
Sterilfiltrationseinheiten	Millipore
Ultrafiltrationsröhrchen	Vivascience Vivaspin
Whatmanpapier 3MM	VWR
Zentrifugenröhrchen (15ml)	Peske
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Peske

4.9 Geräte

Agarosegelkammern	Fisher Scientific
Autoklav	Tecnomara-Fedegari;Tecnoclav 50
Elektrophoreseapparaturen	BioRad
Fluoreszenz-Reader	Polarstar, BMG
Geiger-Müller-Zählrohr	Berthold
Geldokumentationsgerät	BioRad
Geltrockner	BioRad
Handcounter	Berthold; LB122
Heizblock	Fisher Scientific
Inkubationsschüttler	Innova; 4430
Kühlschränke 4°C	Liebherr

Kühlschränke -20°C	Liebherr
Kühlschränke -80°C	Heraeus; HFU 86-450
Magnetrührer	IKA Laborgeräte
Mehrkanalpipetten	Brand
Mikropipetten	Eppendorf; research
Mikrowellenofen	Bosch
Oligonukleotidsynthesizer	ABI 392
PAGE-Apparatur	Bio-Rad; Mini-Protean 3 Cell
PCR-Thermocycler	Biometra
pH-Meßgerät	Knick; pH-Meter 766 Calimatic
Phosphorimager	Biorad
Photometer	Eppendorf; PeqLab
Pipettierhilfe	Eppendorf; Pipetus
Pipettierroboter	Hamilton Robotics
Quench-Flow Apparatus	KinTek; RQF-3
Reagenzglasschüttler	NeoLab
Reinstwasseranlage	Werner; Easy pure UV/UF
Schüttler	IKA; KS 501 digital
Spannungsquelle	Biorad
Speed-Vac	Eppendorf; Concentrator 5301
Spektralphotometer	Biometra
Sterilbank	Kendro; Antaras
Thermoblock	Stuart Scientific
Thermomixer	Eppendorf; Thermomixer comfort
Tischzentrifugen	Eppendorf 5417C
Trockenschrank	WTB-Binder; 1724009900312
Überkopfschüttler	Heidolph; Reax2
UV-Transilluminator	Bachofer
Vortexer	NeoLab; 7-2020
Waagen	Chyo Balance; JL-200 / MK-500C

Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Eppendorf; 5804R

5 Anhang

5.1 Oligonukleotidsequenzen

Sequenzen der verwendeten Primer für die in 2.2.2.2 beschriebene ortsgerichtete Mutagenese zur Konstruktion der D256A-Mutante

Polβ D256A for

5´-CCA CAC AGA AGA ATT GCT ATC AGG TTG ATA CCC AAA G-3´

Polβ D256A rev

5´-CTT TGG GTA TCA ACC TGA TAG CAA TTC TTC TGT GTG G-3´

Polβ codon-optimized D256A for

5´-CCG CAT CGC CGT ATT GCT ATT CGT CTG ATC CCG AAA G-3´

Polβ codon-optimized D256A rev

5´-CTT TCG GGA TCA GAC GAA TAG CAA TAC GGC GAT GCG G-3´

Sequenzen der verwendeten Primer für die in 2.2.2.4 und 2.2.3.2 beschriebene Konstruktion der Mutantenbibliothek

Polβ pET21b Mutagenesis for

5´-GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT AGC-3´

Polβ pET21b Mutagenesis rev

5´-GTG GTG GTG CTC GAG TGC GGC CGC-3´

Polβ pGDR11 Mutagenesis for

5´-CAC CAT CAC CAT CAC CAT ACG GAT CCG ATG-3´

Polβ pGDR11 Mutagenesis rev

5´-GCT AAT TAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC TTA-3´

Sequenzen der in den Abschnitten 2.2.2.4.4, 2.2.2.5, 2.2.3.4 und 2.2.3.5 beschriebenen Untersuchungen verwendeten Primer/Templat-Komplexe

F20TH 5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3´

F20thioA 5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG aT-3´

F20thioAG 5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGg aT-3´

F20thioAGG 5´-CGT TGG TCC TGA AGG Agg aT-3´

Die Kleinbuchstaben zeigen die Position der PTO-Modifikationen.

F90A

5´-CCG TCA GCT GTG CCG TCG CGC AGC ACG CGC CGC CGT GGA CAG AGG ACT GCA GAA AAT CA**A** CCT ATC CTC CTT CAG GAC CAA CGT ACA GAG-3′

F90Ap

5´-CCG TCA GCT GTG CCG TCG CGC AGC ACG CGC CGC CGT GGA CAG AGG ACT GCA GAA AAT CA$\mathbf{A}_p$ CCT ATC CTC CTT CAG GAC CAA CGT ACA GAG-3′

Ap bezeichnet eine stabile abasische Stelle.

Sequenzen der in den Abschnitten 2.2.2.6 und 2.2.4 beschriebenen Untersuchungen verwendeten Primer/Templat-Komplexe

F20TH

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3´

F33A

5´-AAA TCA **A** CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33Ap

5´-AAA TCA **Ap**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

Ap bezeichnet eine stabile abasische Stelle.

Sequenzen der in 2.2.4.7 beschriebenen kinetischen Untersuchungen verwendeten Primer/Templat-Komplexe

F23

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GG-3´

F24G

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGG-3´

F33GCG

5´-AAA TGC **G** CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33oGCG

5´-AAA TGC **oG**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33ApCG

5´-AAA TG**C** **Ap**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33ApAG

5´-AAA TG**A** **Ap**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33ApGG

5´-AAA TG**G** **Ap**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

F33ApTG

5´-AAA TG**T** **Ap**CC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3´

Ap bezeichnet eine stabile abasische Stelle; oG bezeichnet 8-oxo-dG.

Sequenzen der in 2.1 beschriebenen kinetischen Untersuchungen verwendeten Primer/Templat-Komplexe

24mer

5´-GTG GTG CGA AAT TTC TGA CAG ACA-3´

25merT^R

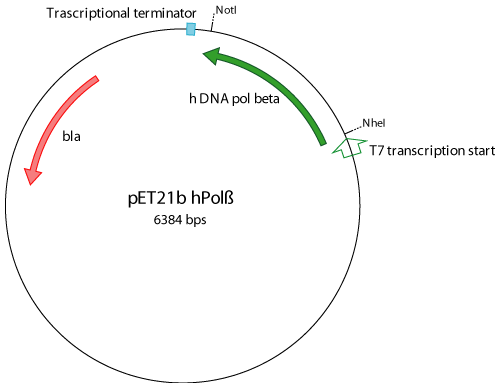
5´-GTG GTG CGA AAT TTC TGA CAG ACA T^R-3´

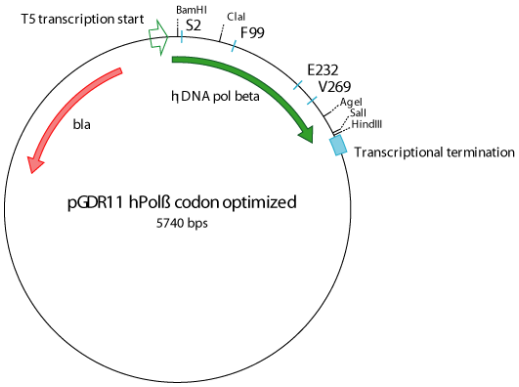
T^R: R=H, Me, Et

36mer

5´-GTG CGT CTG TCA TGT CTG TCA GAA ATT TCG CAC CAC-3´

5.2 Vektorkarten





pET21b_hPolβ

Der ORF für die Polβ wurde über *Nhe*I und *Not*I in pET21b eingeführt. Die Klonierung des WT-Enzyms wurde von Igor Shevelev durchgeführt.

pET21b_hPolβ_Pool1 und pET21b_hPolβ_Pool2

Das generierte Polβ-Random Insert wurde über *Nhe*I und *Not*I in den in pET21b eingeführt.

pGDR11_hPolβ_codon_optimized

Der ORF für die Polβ wurde über *BamH*I und *Sal*I in pGDR11 eingeführt.

pGDR11_hPolβ_Pool3_codon_optimized

Das generierte hPolβ-Random Insert wurde über *BamH*I und *Sal*I in den in pET21b eingeführt.

5.3 Nukleotidsequenzen der klonierten Polβ

5.3.1 Polβ-WT ORF in pET21b

```
                NheI
WT      ATGGCTAGCAAACGGAAGGCGCCGCAGGAGACTCTCAACGGGGGAATCAC
        CGACATGCTCACAGAACTCGCAAACTTTGAGAAGAACGTGAGCCAAGCTA
        TCCACAAGTACAATGCTTACAGAAAAGCAGCATCTGTTATAGCAAAATAC
        CCACACAAAATAAAGAGTGGAGCTGAAGCTAAGAAATTGCCTGGAGTAGG
        AACAAAAATTGCTGAAAAGATTGATGAGTTTTTAGCAACTGGAAAATTAC
        GTAAACTGGAAAAGATTCGGCAGGATGATACGAGTTCATCCATCAATTTC
        CTGACTCGAGTTAGTGGCATTGGTCCATCTGCTGCAAGGAAGTTTGTAGA
        TGAAGGAATTAAAACACTAGAAGATCTCAGAAAAAATGAAGATAAATTGA
        ACCATCATCAGCGAATTGGGCTGAAATATTTTGGGGACTTTGAAAAAAGA
        ATTCCTCGTGAAGAGATGTTACAAATGCAAGATATTGTACTAAATGAAGT
        TAAAAAAGTGGATTCTGAATACATTGCTACAGTCTGTGGCAGTTTCAGAA
        GAGGTGCAGAGTCCAGTGGTGACATGGATGTTCTCCTGACCCATCCCAGC
        TTCACTTCAGAATCAACCAAACAGCCAAAACTGTTACATCAGGTTGTGGA
        GCAGTTACAAAAGGTTCATTTTATCACAGATACCCTGTCAAAGGGTGAGA
        CAAAGTTCATGGGTGTTTGCCAGCTTCCCAGTAAAAATGATGAAAAAGAA
        TATCCACACAGAAGAATTGATATCAGGTTGATACCCAAAGATCAGTATTA
        CTGTGGTGTTCTCTATTTCACTGGGAGTGATATTTTCAATAAGAATATGA
        GGGCTCATGCCCTAGAAAAGGGTTTCACAATCAATGAGTACACCATCCGT
        CCCTTGGGAGTCACTGGAGTTGCAGGAGAACCCCTGCCAGTGGATAGTGA
        AAAAGACATCTTTGATTACATCCAGTGGAAATACCGGGAACCCAAGGACC
        GGAGCGAAGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
                  NotI          His-Tag          Stop
```

Fett: Start- und Stoppkodon.

Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen für die Klonierung

Kursiv und unterstrichen: His-Tag

5.3.2 Polβ-2N7 ORF in pET21b

NheI

2N7 **ATG**GCTAGCAAACGGAAGGCGCCGCAGGAGACTCTCAACGGGGGAATCAC
CGACATGCTCACAGAACTCGCAAACTTTGAGAAGAACGTGAGCCAAGCTA
TCCACAAGTACAATGCTTACAGAAAAGCAGCATCTGTTATAGCAAAATAC
CCACACAAAATAAAGAGTGGAGCTGAAGCTAAGAAATTGCCTGGAGTAGG
AACAAAAATTGCTGAAAAGATTGATGAGTTTTTAGCAACTGGAAAATTAC
GTAAACTGGAAAAGATTCGGCAGGATGATACGAGTTCATCCATCAATTTC
CTGACTCGAGTTAGTGGCATTGGTCCATCTGCTGCAAGGAAGTTTGTAGA
TGAAGGAATTAAAACACTAGAAGATCTCAGAAAAAATGAAGATAAATTGA
ACCATCATCAGCGAATTGGGCTGAAATATTTTGGGGACTTTGAAAAAAGA
ATTCCTCGTGAAGAGATGTTACAAATGCAAGATATTGTACTAAATGAAGT
TAAAAAAGTGGATTCTGAATACATTGCTACAGTCTGTGGCAGTTTCAGAA
GAGGTGCAGAGTCCAGTGGTGACATGGATGTTCTCCTGACCCATCCCAGC
TTCACTTCAGAATCAACCAAACAGCCAAAACTGTTACATCAGGTTGTGGA
GCAGTTACAAAAGGTTCATTTTATCACAGATACCCTGTCAAAGGGTGAGA
CAAAGTTCATGGGTGTTTGCCAGCTTCCCAGTAAAAATGATGAAAAAGAA
TATCCACACAGAAGAATTGATATCAGGTTGATACCCAAAGATCAGTATTA
CTGTGGT**ATT**CTCTATTTCACTGGGAGTGATATTTTCAATAAGAATATGA
GGGCTCATGCCCTAGAAAAGGGTTTCACAATCAATGAGTACACCATCCGT
CCCTTGGGAGTCACTGGAGTTGCAGGAGAACCCCTGCCAGTGGATAGTGA
AAAAGACATCTTTGATTACATCCAGTGGAAATACCGGGAACCCAAGGACC
GGAGCGAAGCGGCCGCACTCGAG*CACCACCACCACCACCAC***TGA**

NotI His-Tag Stop

Fett: Start- und Stoppkodon.

Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen für die Klonierung

Kursiv und unterstrichen: His-Tag

Rot und fett: Mutation

5.3.3 Polβ-WT ORF in pGDR11

```
                                   His-Tag                BamHI
WT      ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGATGAGCAAACG
        TAAAGCGCCGCAGGAAACCCTGAACGGCGGCATTACCGATATGCTGACCG
        AACTGGCCAACTTTGAAAAAAACGTGAGCCAGGCGATCCATAAATATAAC
        GCGTATCGTAAAGCGGCGAGCGTGATTGCGAAATATCCGCACAAAATTAA
        AAGCGGTGCGGAAGCGAAAAAACTGCCGGGCGTGGGCACCAAAATTGCGG
        AAAAAATCGATGAATTTCTGGCCACCGGCAAACTGCGTAAACTGGAAAAA
        ATTCGCCAGGATGATACCAGCAGCAGCATTAACTTTCTGACCCGTGTGAG
        CGGCATTGGTCCGAGCGCGGCGCGTAAATTTGTGGATGAAGGCATCAAAA
        CCCTGGAGGATCTGCGTAAAAACGAAGATAAACTGAACCATCATCAGCGT
        ATTGGCCTGAAATATTTTGGCGATTTCGAAAAACGTATTCCGCGTGAAGA
        AATGCTGCAGATGCAGGATATTGTGCTGAACGAAGTGAAAAAAGTGGATA
        CGAATATATTGCGACCGTGTGCGGCAGCTTTCGTCGTGGCGCGGAAAGCA
        GCGGCGATATGGATGTGCTGCTGACCCATCCGAGCTTTACCAGCGAAAGC
        ACCAAACAGCCGAAACTGCTGCATCAGGTGGTGGAACAGCTGCAGAAAGT
        GCATTTTATTACCGATACCCTGAGCAAAGGCGAAACCAAATTTATGGGCG
        TGTGCCAGCTGCCGAGCAAAAACGATGAAAAAGAATATCCGCATCGCCGT
        ATTGATATTCGTCTGATCCCGAAAGATCAGTATTATTGCGGCGTGCTGTA
        TTTTACCGGCAGCGATATCTTCAACAAAAACATGCGTGCGCATGCGCTGG
        AAAAAGGCTTTACCATCAACGAATACACCATTCGTCCGCTGGGCGTGACC
        GGTGTTGCGGGTGAACCGCTGCCGGTGGATAGCGAAAAAGATATCTTCGA
        TTACATCCAGTGGAAATATCGTGAACCGAAAGATCGTAGCGAATAAGTCG
        AC                                                 Stop  SalI
```

Fett: Start- und Stoppkodon.

Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen für die Klonierung

Kursiv und unterstrichen: His-Tag

5.3.4 Polβ-5P20 ORF in pGDR11

```
                                 His-Tag          BamHI
5P20    ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGATGGGCAAACG
        TAAAGCGCCGCAGGAAACCCTGAACGGCGGCATTACCGATATGCTGACCG
        AACTGGCCAACTTTGAAAAAAACGTGAGCCAGGCGATCCATAAATATAAC
        GCGTATCGTAAAGCGGCGAGCGTGATTGCGAAATATCCGCACAAAATTAA
        AAGCGGTGCGGAAGCGAAAAAACTGCCGGGCGTGGGCACCAAAATTGCGG
        AAAAAATCGATGAATTTCTGGCCACCGGCAAACTGCGTAAACTGGAAAAA
        ATTCGCCAGGATGATACCAGCAGCAGCATTAACCTTCTGACCCGTGTGAG
        CGGCATTGGTCCGAGCGCGGCGCGTAAATTTGTGGATGAAGGCATCAAAA
        CCCTGGAGGATCTGCGTAAAAACGAAGATAAACTGAACCATCATCAGCGT
        ATTGGCCTGAAATATTTTGGCGATTTCGAAAAGCGTATTCCGCGTGAAGA
        AATGCTGCAGATGCAGGATATTGTGCTGAACGAAGTGAAAAAAGTGGATA
        CGAATATATTGCGACCGTGTGCGGCAGCTTTCGTCGTGGCGCGGAAAGCA
        GCGGCGATATGGATGTGCTGCTGACCCATCCGAGCTTTACCAGCGAAAGC
        ACCAAACAGCCGAAACTGCTGCATCAGGTGGTGGAACAGCTGCAGAAAGT
        GCATTTTATTACCGATACCCTGAGCAAAGGCAAAACCAAATTTATGGGCG
        TGTGCCAGCTGCCGAGCAAAAACGATGAAAAAGAATATCCGCATCGCCGT
        ATTGATATTCGTCTGATCCCGAAAGATCAGTATTATTGCGGCATGCTGTA
        TTTTACCGGCAGCGATATCTTCAACAAAAACATGCGTGCGCATGCGCTGG
        AAAAAGGCTTTACCATCAACGAATACACCATTCGTCCGCTGGGCGTGACC
        GGTGTTGCGGGTGAACCGCTGCCGGTGGATAGCGAAAAAGATATCTTCGA
        TTACATCCAGTGGAAATATCGTGAACCGAAAGATCGTAGCGAATAAGTCG
        AC                                          Stop  SalI
```

Fett: Start- und Stoppkodon.

Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen für die Klonierung

Kursiv und unterstrichen: His-Tag

Rot und fett: Mutationen

5.4 Proteinsequenzen

5.4.1 Sequenz der Polβ in Plasmid pET21b

WT

MASKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKY
PHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINF
LTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKR
IPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPS
FTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKE
YPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIR
PLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSEAAALEHHHHHH

Fett: Sequenz der humanen Polβ

Unterstrichen: His-Tag

2N7

MASKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKY
PHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINF
LTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKR
IPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPS
FTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKE
YPHRRIDIRLIPKDQYYCGILYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIR
PLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSEAAALEHHHHHH

Fett: Sequenz der humanen Polβ

Unterstrichen: His-Tag

Rot und fett: Mutation

5.4.2 Sequenz der Polβ in Plasmid pGDR11

WT

MRGSHHHHHHTDP**MSKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKA**
ASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSI
NFLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKRIPR
EEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPSFTSESTKQ
PKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPK
DQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEK
DIFDYIQWKYREPKDRSE

Fett: Sequenz der humanen Polβ

Unterstrichen: His-Tag

5P20

MRGSHHHHHHTDP**MGKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKA**
ASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSI
NLLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKRIPR
EEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPSFTSESTKQ
PKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGKTKFMGVCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPK
DQYYCGMLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEK
DIFDYIQWKYREPKDRSE

Fett: Sequenz der humanen Polβ

Unterstrichen: His-Tag

Rot und fett: Mutationen

5.5 Aminosäurealignment der verschiedenen Varianten mit der Wildtyp-Sequenz

5.5.1 Mutante 2N7

```
WT      MASKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKY
N7      MASKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKY
        **************************************************
WT      PHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINF
N7      PHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINF
        **************************************************
WT      LTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKR
N7      LTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKR
        **************************************************
WT      IPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPS
N7      IPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAESSGDMDVLLTHPS
        **************************************************
WT      FTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKE
N7      FTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKE
        **************************************************
WT      YPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIR
N7      YPHRRIDIRLIPKDQYYCGILYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIR
        ********************:*****************************
WT      PLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSEAAALEHHHHHH
N7      PLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSEAAALEHHHHHH
        ************************************************
```

5.5.2 Mutante 5P20

```
WT      MRGSHHHHHHTDPMSKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYN
5P20    MRGSHHHHHHTDPMGKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYN
        ************** ***********************************
WT      AYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEK
5P20    AYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEK
        **************************************************
WT      IRQDDTSSSINFLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQR
5P20    IRQDDTSSSINLLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQR
        *********** ******************************************
WT      IGLKYFGDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAES
5P20    IGLKYFGDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGSFRRGAES
        **************************************************
WT      SGDMDVLLTHPSFTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMG
5P20    SGDMDVLLTHPSFTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGKTKFMG
        ********************************************* *****
WT      VCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHAL
5P20    VCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPKDQYYCGMLYFTGSDIFNKNMRAHAL
        ******************************** ******************
WT      EKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSE
5P20    EKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSE
        ************************************************
```

5.6 Nomenklatur der natürlichen Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Aspartat	D	Asp
Glutamat	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met
Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

5.7 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad (Winkelmaß)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
1x	Einfach konzentriert
10x	Zehnfach konzentriert
^{32}P	Phosphor 32 Isotop
A	Adenosin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5’-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytidin, Kohlenstoff
cDNA	*complementary DNA* (Komplementär-DNA)
CH_3OH	Methanol
CPG	controlled pore glass
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	2´-Desoxycytidin 5´-triphosphat
ddCTP	2’,3’-Didesoxycytidin-5´-triphosphat
ddNTP	2’,3’-Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	2’-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5’-triphosphat
ds	*double stranded* (doppelsträngig)
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiotreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Exo	Exonukleaseaktivität
F	Flureszenz
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde
HTS	High throughput screening
IPTG	1-Isopropyl-ß-D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotid-5'-triphosphat
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte

ORF	Open reading frame
p.a.	Per analysii (Reinheitsgrad)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pM	pikomolar
pmol	Pikomol
Pol	DNA-Polymerase
Polβ	DNA-Polymerase β
Rel.	Relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rotations per minute* (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunden
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
ss	single stranded (einzelsträngig)
SSB (Protein)	Single strand binding (protein)
ssDNA	einzelsträngige DNA
t	Zeit
T	Thymidin
T4	T4-Phage
T7	T7-Phage
T. aq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA-(Puffer)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TLS	Translesion synthesis
Tm	Schmelztemperatur (von DNA)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Units, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

V	Volt
V	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp

6 Literatur

1. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.* Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
2. Bessman, M.J., A. Kornberg, I.R. Lehman, and E.S. Simms, *Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid.* Biochim Biophys Acta, 1956. **21**(1): p. 197-8.
3. Hubscher, U., G. Maga, and S. Spadari, *Eukaryotic DNA polymerases.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 133-63.
4. Kelman, Z. and M. O'Donnell, *DNA replication: enzymology and mechanisms.* Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(2): p. 185-95.
5. Kornberg, A. and T.A. Baker, *DNA Replication*. 2nd ed. 1992: WH Freeman and Company, NY.
6. Lehman, I.R., S.B. Zimmerman, J. Adler, M.J. Bessman, E.S. Simms, and A. Kornberg, *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. V. Chemical Composition of Enzymatically Synthesized Deoxyribonucleic Acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1958. **44**(12): p. 1191-6.
7. Kunkel, T.A. and K. Bebenek, *DNA replication fidelity.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 497-529.
8. Wood, R.D., *DNA repair in eukaryotes.* Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 135-67.
9. Moon, A.F., M. Garcia-Diaz, V.K. Batra, W.A. Beard, K. Bebenek, T.A. Kunkel, S.H. Wilson, and L.C. Pedersen, *The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases.* DNA Repair (Amst), 2007. **6**(12): p. 1709-25.
10. Prakash, S., R.E. Johnson, and L. Prakash, *Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 317-53.
11. Goodman, M.F., *Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 17-50.
12. Cech, T.R., *Life at the End of the Chromosome: Telomeres and Telomerase.* Angew Chem Int Ed Engl, 2000. **39**(1): p. 34-43.
13. Joyce, C.M. and T.A. Steitz, *Function and structure relationships in DNA polymerases.* Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 777-822.
14. Steitz, T.A., *DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17395-8.
15. Johnson, R.E., L. Prakash, and S. Prakash, *Biochemical evidence for the requirement of Hoogsteen base pairing for replication by human DNA polymerase iota.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10466-71.
16. Nair, D.T., R.E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, and A.K. Aggarwal, *Human DNA polymerase iota incorporates dCTP opposite template G via a G.C + Hoogsteen base pair.* Structure, 2005. **13**(10): p. 1569-77.

17. Filee, J., P. Forterre, T. Sen-Lin, and J. Laurent, *Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins.* J Mol Evol, 2002. **54**(6): p. 763-73.
18. Parikh, S.S., C.D. Mol, and J.A. Tainer, *Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway.* Structure, 1997. **5**(12): p. 1543-50.
19. Johnson, K.A., *Conformational coupling in DNA polymerase fidelity.* Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 685-713.
20. Batra, V.K., W.A. Beard, D.D. Shock, J.M. Krahn, L.C. Pedersen, and S.H. Wilson, *Magnesium-induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex.* Structure, 2006. **14**(4): p. 757-66.
21. Kool, E.T., J.C. Morales, and K.M. Guckian, *Mimicking the Structure and Function of DNA: Insights into DNA Stability and Replication.* Angew Chem Int Ed, 2000. **39**(6): p. 990-1009.
22. Creighton, S., L.B. Bloom, and M.F. Goodman, *Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading, and lesion bypass efficiencies.* Methods Enzymol, 1995. **262**: p. 232-56.
23. Scharer, O.D., *Chemistry and biology of DNA repair.* Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(26): p. 2946-74.
24. Frederico, L.A., T.A. Kunkel, and B.R. Shaw, *A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy.* Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2532-7.
25. Nakamura, J., V.E. Walker, P.B. Upton, S.Y. Chiang, Y.W. Kow, and J.A. Swenberg, *Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions.* Cancer Res, 1998. **58**(2): p. 222-5.
26. Hsu, G.W., M. Ober, T. Carell, and L.S. Beese, *Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.* Nature, 2004.
27. Kunkel, T.A., *The high cost of living. American Association for Cancer Research Special Conference: endogenous sources of mutations, Fort Myers, Florida, USA, 11-15 November 1998.* Trends Genet, 1999. **15**(3): p. 93-4.
28. Aller, P., M.A. Rould, M. Hogg, S.S. Wallace, and S. Doublie, *A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 814-8.
29. Kao, J.Y., I. Goljer, T.A. Phan, and P.H. Bolton, *Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR.* J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17787-93.
30. Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components.* J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 88-102.
31. Drake, J.W., *A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7160-4.
32. Drake, J.W., *The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **870**: p. 100-7.

33. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 681-710.
34. Chang, L.M. and F.J. Bollum, *Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase in mammalian cells.* J Biol Chem, 1971. **246**(18): p. 5835-7.
35. Baril, E.F., O.E. Brown, M.D. Jenkins, and J. Laszlo, *Deoxyribonucleic acid polymerase with rat liver ribosomes and smooth membranes. Purification and properties of the enzymes.* Biochemistry, 1971. **10**(11): p. 1981-92.
36. Wilson, S.H., *Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta.* Mutat Res, 1998. **407**(3): p. 203-15.
37. Beard, W.A. and S.H. Wilson, *Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta.* Mutat Res, 2000. **460**(3-4): p. 231-44.
38. Pelletier, H., M.R. Sawaya, A. Kumar, S.H. Wilson, and J. Kraut, *Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP.* Science, 1994. **264**(5167): p. 1891-903.
39. Pelletier, H., M.R. Sawaya, W. Wolfle, S.H. Wilson, and J. Kraut, *Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity.* Biochemistry, 1996. **35**(39): p. 12742-61.
40. Sawaya, M.R., R. Prasad, S.H. Wilson, J. Kraut, and H. Pelletier, *Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism.* Biochemistry, 1997. **36**(37): p. 11205-15.
41. Batra, V.K., D.D. Shock, R. Prasad, W.A. Beard, E.W. Hou, L.C. Pedersen, J.M. Sayer, H. Yagi, S. Kumar, D.M. Jerina, and S.H. Wilson, *Structure of DNA polymerase beta with a benzo[c]phenanthrene diol epoxide-adducted template exhibits mutagenic features.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17231-6.
42. Prasad, R., V.K. Batra, X.P. Yang, J.M. Krahn, L.C. Pedersen, W.A. Beard, and S.H. Wilson, *Structural insight into the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase mechanism.* DNA Repair (Amst), 2005. **4**(12): p. 1347-57.
43. Vaisman, A., M.W. Warren, and S.G. Chaney, *The effect of DNA structure on the catalytic efficiency and fidelity of human DNA polymerase beta on templates with platinum-DNA adducts.* J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18999-9005.
44. Singh, S.B., W.A. Beard, B.E. Hingerty, S.H. Wilson, and S. Broyde, *Interactions between DNA polymerase beta and the major covalent adduct of the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide with DNA at a primer-template junction.* Biochemistry, 1998. **37**(3): p. 878-84.
45. Beard, W.A. and S.H. Wilson, *Structure and mechanism of DNA polymerase Beta.* Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 361-82.
46. Li, Y., S. Korolev, and G. Waksman, *Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation.* Embo J, 1998. **17**(24): p. 7514-25.
47. Doublie, S., S. Tabor, A.M. Long, C.C. Richardson, and T. Ellenberger, *Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 A resolution.* Nature, 1998. **391**(6664): p. 251-8.

48. Li, Y., Y. Kong, S. Korolev, and G. Waksman, *Crystal structures of the Klenow fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates.* Protein Sci, 1998. 7(5): p. 1116-23.
49. Kiefer, J.R., C. Mao, J.C. Braman, and L.S. Beese, *Visualizing DNA replication in a catalytically active Bacillus DNA polymerase crystal.* Nature, 1998. **391**(6664): p. 304-7.
50. Rodriguez, A.C., H.W. Park, C. Mao, and L.S. Beese, *Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus sp. 9 degrees N-7.* J Mol Biol, 2000. **299**(2): p. 447-62.
51. Ling, H., F. Boudsocq, R. Woodgate, and W. Yang, *Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication.* Cell, 2001. **107**(1): p. 91-102.
52. Beard, W.A., D.D. Shock, X.P. Yang, S.F. DeLauder, and S.H. Wilson, *Loss of DNA polymerase beta stacking interactions with templating purines, but not pyrimidines, alters catalytic efficiency and fidelity.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8235-42.
53. Gu, H., J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky, *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting.* Science, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
54. Sobol, R.W., J.K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R.K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky, and S.H. Wilson, *Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair.* Nature, 1996. **379**(6561): p. 183-6.
55. Lindahl, T. and R.D. Wood, *Quality control by DNA repair.* Science, 1999. **286**(5446): p. 1897-905.
56. Nilsen, H. and H.E. Krokan, *Base excision repair in a network of defence and tolerance.* Carcinogenesis, 2001. **22**(7): p. 987-98.
57. Wiebauer, K. and J. Jiricny, *Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(15): p. 5842-5.
58. Singhal, R.K., R. Prasad, and S.H. Wilson, *DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract.* J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 949-57.
59. Matsumoto, Y. and K. Kim, *Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair.* Science, 1995. **269**(5224): p. 699-702.
60. Kraynov, V.S., B.G. Werneburg, X. Zhong, H. Lee, J. Ahn, and M.D. Tsai, *DNA polymerase beta: analysis of the contributions of tyrosine-271 and asparagine-279 to substrate specificity and fidelity of DNA replication by pre-steady-state kinetics.* Biochem J, 1997. **323** (**Pt 1**): p. 103-11.
61. Guillet, M. and S. Boiteux, *Origin of endogenous DNA abasic sites in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8386-94.
62. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells.* Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 445-76.
63. Klungland, A. and S. Bjelland, *Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1.* DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): p. 481-8.

64. Weinberg, R.A., ¬*The*¬ *biology of cancer*. 2007, New York u.a.: Garland Science. XIX, 796 S. + 1 CD-ROM (12 cm), 1 Poster.
65. Idriss, H.T., O. Al-Assar, and S.H. Wilson, *DNA polymerase beta.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(4): p. 321-4.
66. Krokan, H.E., H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei, and G. Slupphaug, *Base excision repair of DNA in mammalian cells.* FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 73-7.
67. Bielas, J.H., K.R. Loeb, B.P. Rubin, L.D. True, and L.A. Loeb, *Human cancers express a mutator phenotype.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18238-42.
68. Starcevic, D., S. Dalal, and J.B. Sweasy, *Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?* Cell Cycle, 2004. **3**(8): p. 998-1001.
69. Lang, T., M. Maitra, D. Starcevic, S.X. Li, and J.B. Sweasy, *A DNA polymerase beta mutant from colon cancer cells induces mutations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6074-9.
70. Dalal, S., S. Hile, K.A. Eckert, K.W. Sun, D. Starcevic, and J.B. Sweasy, *Prostate-cancer-associated I260M variant of DNA polymerase beta is a sequence-specific mutator.* Biochemistry, 2005. **44**(48): p. 15664-73.
71. Sweasy, J.B., T. Lang, D. Starcevic, K.W. Sun, C.C. Lai, D. Dimaio, and S. Dalal, *Expression of DNA polymerase {beta} cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14350-5.
72. Sweasy, J.B., J.M. Lauper, and K.A. Eckert, *DNA polymerases and human diseases.* Radiat Res, 2006. **166**(5): p. 693-714.
73. Lang, T., S. Dalal, A. Chikova, D. DiMaio, and J.B. Sweasy, *The E295K DNA polymerase beta gastric cancer-associated variant interferes with base excision repair and induces cellular transformation.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(15): p. 5587-96.
74. Dalal, S., A. Chikova, J. Jaeger, and J.B. Sweasy, *The Leu22Pro tumor-associated variant of DNA polymerase beta is dRP lyase deficient.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): p. 411-22.
75. Lehmann, A.R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kannouche, and C.M. Green, *Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch.* DNA Repair (Amst), 2007. **6**(7): p. 891-9.
76. Lehmann, A.R., *Translesion synthesis in mammalian cells.* Exp Cell Res, 2006. **312**(14): p. 2673-6.
77. Silvian, L.F., E.A. Toth, P. Pham, M.F. Goodman, and T. Ellenberger, *Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from Sulfolobus solfataricus.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(11): p. 984-9.
78. Ulrich, H.D., *The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO.* Chembiochem, 2005. **6**(10): p. 1735-43.
79. Kokoska, R.J., S.D. McCulloch, and T.A. Kunkel, *The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase eta and Sulfolobus solfataricus Dpo4.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50537-45.
80. Lawrence, C.W., A. Borden, S.K. Banerjee, and J.E. LeClerc, *Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector.* Nucleic Acids Res, 1990. **18**(8): p. 2153-7.

81. Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, J.S. Taylor, and Z. Wang, *Response of human DNA polymerase iota to DNA lesions.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(4): p. 928-35.
82. Johnson, R.E., M.T. Washington, L. Haracska, S. Prakash, and L. Prakash, *Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions.* Nature, 2000. **406**(6799): p. 1015-9.
83. Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, O. Rechkoblit, J.S. Taylor, N.E. Geacintov, and Z. Wang, *Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase eta.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(23): p. 4717-24.
84. Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechkoblit, J.S. Taylor, N.E. Geacintov, and Z. Wang, *Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa in vitro.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(21): p. 4138-46.
85. Ohashi, E., T. Ogi, R. Kusumoto, S. Iwai, C. Masutani, F. Hanaoka, and H. Ohmori, *Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa.* Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1589-94.
86. Haracska, L., I. Unk, R.E. Johnson, B.B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash, *Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase kappa by PCNA.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 784-91.
87. Haracska, L., S. Prakash, and L. Prakash, *Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15546-51.
88. Haracska, L., N. Acharya, I. Unk, R.E. Johnson, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash, *A single domain in human DNA polymerase iota mediates interaction with PCNA: implications for translesion DNA synthesis.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1183-90.
89. Ling, H., F. Boudsocq, R. Woodgate, and W. Yang, *Snapshots of replication through an abasic lesion; structural basis for base substitutions and frameshifts.* Mol Cell, 2004. **13**(5): p. 751-62.
90. Potapova, O., N.D. Grindley, and C.M. Joyce, *The mutational specificity of the Dbh lesion bypass polymerase and its implications.* J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 28157-66.
91. Zharkov, D.O., *Base excision DNA repair.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(10): p. 1544-65.
92. Echols, H. and M.F. Goodman, *Fidelity mechanisms in DNA replication.* Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 477-511.
93. Kool, E.T., *Active site tightness and substrate fit in DNA replication.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 191-219.
94. Kunkel, T.A., *DNA replication fidelity.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 16895-8.
95. Rothwell, P.J. and G. Waksman, *Structure and mechanism of DNA polymerases.* Adv Protein Chem, 2005. **71**: p. 401-40.
96. McCulloch, S.D. and T.A. Kunkel, *The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases.* Cell Res, 2008. **18**(1): p. 148-61.
97. Kool, E.T. and H.O. Sintim, *The difluorotoluene debate--a decade later.* Chem Commun (Camb), 2006(35): p. 3665-75.
98. Petruska, J., M.F. Goodman, M.S. Boosalis, L.C. Sowers, C. Cheong, and I. Tinoco, Jr., *Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6252-6.

99. Summerer, D. and A. Marx, *DNA Polymerase Selectivity: Sugar Interactions Monitored with High-Fidelity Nucleotides.* Angew Chem Int Ed, 2001. **40**(19): p. 3693-3695.
100. Strerath, M., D. Summerer, and A. Marx, *Varied DNA polymerase-substrate interactions in the nucleotide binding pocket.* Chembiochem, 2002. **3**(6): p. 578-80.
101. Cramer, J., M. Strerath, A. Marx, and T. Restle, *Exploring the effects of active site constraints on HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerase fidelity.* J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43593-8.
102. Strerath, M., J. Cramer, T. Restle, and A. Marx, *Implications of active site constraints on varied DNA polymerase selectivity.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(38): p. 11230-1.
103. Cramer, J., G. Rangam, A. Marx, and T. Restle, *Varied Active-Site Constraints in the Klenow Fragment of E. coli DNA Polymerase I and the Lesion-Bypass Dbh DNA Polymerase.* Chembiochem, 2008. **9**(8): p. 1181.
104. Kim, T.W., J.C. Delaney, J.M. Essigmann, and E.T. Kool, *Probing the active site tightness of DNA polymerase in subangstrom increments.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15803-8.
105. Mizukami, S., T.W. Kim, S.A. Helquist, and E.T. Kool, *Varying DNA base-pair size in subangstrom increments: evidence for a loose, not large, active site in low-fidelity Dpo4 polymerase.* Biochemistry, 2006. **45**(9): p. 2772-8.
106. Kim, T.W., L.G. Brieba, T. Ellenberger, and E.T. Kool, *Functional evidence for a small and rigid active site in a high fidelity DNA polymerase: probing T7 DNA polymerase with variably sized base pairs.* J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2289-95.
107. Sintim, H.O. and E.T. Kool, *Remarkable sensitivity to DNA base shape in the DNA polymerase active site.* Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(12): p. 1974-9.
108. Sintim, H.O. and E.T. Kool, *Enhanced base pairing and replication efficiency of thiothymidines, expanded-size variants of thymidine.* J Am Chem Soc, 2006. **128**(2): p. 396-7.
109. Silverman, A.P., Q. Jiang, M.F. Goodman, and E.T. Kool, *Steric and electrostatic effects in DNA synthesis by the SOS-induced DNA polymerases II and IV of Escherichia coli.* Biochemistry, 2007. **46**(48): p. 13874-81.
110. Garcia-Diaz, M. and T.A. Kunkel, *Mechanism of a genetic glissando: structural biology of indel mutations.* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(4): p. 206-14.
111. Kunkel, T.A., *Misalignment-mediated DNA synthesis errors.* Biochemistry, 1990. **29**(35): p. 8003-11.
112. Bebenek, K., C.M. Joyce, M.P. Fitzgerald, and T.A. Kunkel, *The fidelity of DNA synthesis catalyzed by derivatives of Escherichia coli DNA polymerase I.* J Biol Chem, 1990. **265**(23): p. 13878-87.
113. Osheroff, W.P., H.K. Jung, W.A. Beard, S.H. Wilson, and T.A. Kunkel, *The fidelity of DNA polymerase beta during distributive and processive DNA synthesis.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3642-50.
114. Carver, T.E., Jr., R.A. Hochstrasser, and D.P. Millar, *Proofreading DNA: recognition of aberrant DNA termini by the Klenow fragment of DNA polymerase I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10670-4.

115. Morales, J.C. and E.T. Kool, *Minor Groove Interactions between Polymerase and DNA: More Essential to Replication than Watson-Crick Hydrogen Bonds?* J. Am. Chem. Soc., 1999. **121**(10): p. 2323-2324.
116. Morales, J.C. and E.T. Kool, *Functional hydrogen-bonding map of the minor groove binding tracks of six DNA polymerases.* Biochemistry, 2000. **39**(42): p. 12979-88.
117. Spratt, T.E., *Identification of hydrogen bonds between Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment) and the minor groove of DNA by amino acid substitution of the polymerase and atomic substitution of the DNA.* Biochemistry, 2001. **40**(9): p. 2647-52.
118. Thompson, E.H., M.F. Bailey, E.J. van der Schans, C.M. Joyce, and D.P. Millar, *Determinants of DNA mismatch recognition within the polymerase domain of the Klenow fragment.* Biochemistry, 2002. **41**(3): p. 713-22.
119. Summerer, D. and A. Marx, *Differential minor groove interactions between DNA polymerase and sugar backbone of primer and template strands.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(6): p. 910-1.
120. Strerath, M., J. Gaster, and A. Marx, *Recognition of remote mismatches by DNA polymerases.* Chembiochem, 2004. **5**(11): p. 1585-8.
121. Bebenek, K., M. Garcia-Diaz, M.C. Foley, L.C. Pedersen, T. Schlick, and T.A. Kunkel, *Substrate-induced DNA strand misalignment during catalytic cycling by DNA polymerase lambda.* EMBO Rep, 2008. **9**(5): p. 459-64.
122. Garcia-Diaz, M., K. Bebenek, J.M. Krahn, L.C. Pedersen, and T.A. Kunkel, *Structural analysis of strand misalignment during DNA synthesis by a human DNA polymerase.* Cell, 2006. **124**(2): p. 331-42.
123. Summerer, D. and A. Marx, *DNA Polymerase Selectivity: Sugar Interactions Monitored with High-Fidelity Nucleotides This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft. We thank Professor Dr. Michael Famulok for his continuing support.* Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**(19): p. 3693-3695.
124. Strerath, M., J. Gaster, D. Summerer, and A. Marx, *Increased single-nucleotide discrimination of PCR by primer probes bearing hydrophobic 4'C modifications.* Chembiochem, 2004. **5**(3): p. 333-9.
125. Villbrandt, B., G. Sagner, and D. Schomburg, *Investigations on the thermostability and function of truncated Thermus aquaticus DNA polymerase fragments.* Protein Eng, 1997. **10**(11): p. 1281-8.
126. Kosa, J.L. and J.B. Sweasy, *3'-Azido-3'-deoxythymidine-resistant mutants of DNA polymerase beta identified by in vivo selection.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3851-8.
127. Brakmann, S., *Discovery of superior enzymes by directed molecular evolution.* Chembiochem, 2001. **2**(12): p. 865-71.
128. Ghadessy, F.J., J.L. Ong, and P. Holliger, *Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4552-7.
129. Fa, M., A. Radeghieri, A.A. Henry, and F.E. Romesberg, *Expanding the substrate repertoire of a DNA polymerase by directed evolution.* J Am Chem Soc, 2004. **126**(6): p. 1748-54.

130. Summerer, D., N.Z. Rudinger, I. Detmer, and A. Marx, *Enhanced fidelity in mismatch extension by DNA polymerase through directed combinatorial enzyme design.* Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(30): p. 4712-5.
131. Sauter, K.B. and A. Marx, *Evolving thermostable reverse transcriptase activity in a DNA polymerase scaffold.* Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(45): p. 7633-5.
132. Rudinger, N.Z., R. Kranaster, and A. Marx, *Hydrophobic amino acid and single-atom substitutions increase DNA polymerase selectivity.* Chem Biol, 2007. **14**(2): p. 185-94.
133. Strerath, M., C. Gloeckner, D. Liu, A. Schnur, and A. Marx, *Directed DNA polymerase evolution: effects of mutations in motif C on the mismatch-extension selectivity of thermus aquaticus DNA polymerase.* Chembiochem, 2007. **8**(4): p. 395-401.
134. Gloeckner, C., K.B. Sauter, and A. Marx, *Evolving a thermostable DNA polymerase that amplifies from highly damaged templates.* Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(17): p. 3115-7.
135. Brakmann, S., *Directed evolution as a tool for understanding and optimizing nucleic acid polymerase function.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(22): p. 2634-46.
136. Zhao, H., J.C. Moore, A.A. Volkov, and F.H. Arnold, *Methods for Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution*, in *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, A.L. Demain and J.E. Davies, Editors. 1999, ASM Pr.: Washington, DC. p. 597-604.
137. Camps, M., J. Naukkarinen, B.P. Johnson, and L.A. Loeb, *Targeted gene evolution in Escherichia coli using a highly error-prone DNA polymerase I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9727-32.
138. Fujii, R., M. Kitaoka, and K. Hayashi, *One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(19): p. e145.
139. Giver, L. and F.H. Arnold, *Combinatorial protein design by in vitro recombination.* Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(3): p. 335-8.
140. Henke, E. and U.T. Bornscheuer, *Directed evolution of an esterase from Pseudomonas fluorescens. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay.* Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 1029-33.
141. Lu, X., H. Hirata, Y. Yamaji, M. Ugaki, and S. Namba, *Random mutagenesis in a plant viral genome using a DNA repair-deficient mutator Escherichia coli strain.* J Virol Methods, 2001. **94**(1-2): p. 37-43.
142. Moore, J.C. and F.H. Arnold, *Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents.* Nat Biotechnol, 1996. **14**(4): p. 458-67.
143. Kermekchiev, M.B., A. Tzekov, and W.M. Barnes, *Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(21): p. 6139-47.
144. Tee, K.L. and U. Schwaneberg, *A screening system for the directed evolution of epoxygenases: importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxidation.* Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(32): p. 5380-3.

145. Sweasy, J.B. and L.A. Loeb, *Mammalian DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in Escherichia coli.* J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1407-10.
146. Sweasy, J.B. and L.A. Loeb, *Detection and characterization of mammalian DNA polymerase beta mutants by functional complementation in Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4626-30.
147. Suzuki, M., A.K. Avicola, L. Hood, and L.A. Loeb, *Low fidelity mutants in the O-helix of Thermus aquaticus DNA polymerase I.* J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11228-35.
148. Skandalis, A. and L.A. Loeb, *Enzymatic properties of rat DNA polymerase beta mutants obtained by randomized mutagenesis.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(11): p. 2418-26.
149. Leconte, A.M., L. Chen, and F.E. Romesberg, *Polymerase evolution: efforts toward expansion of the genetic code.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(36): p. 12470-1.
150. Phizicky, E.M. and S. Fields, *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis.* Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 94-123.
151. Ghadessy, F.J. and P. Holliger, *Compartmentalized self-replication: a novel method for the directed evolution of polymerases and other enzymes.* Methods Mol Biol, 2007. **352**: p. 237-48.
152. Jung, K.H. and A. Marx, *Nucleotide analogues as probes for DNA polymerases.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(18): p. 2080-91.
153. Zhou, B.L., J.D. Pata, and T.A. Steitz, *Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain.* Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 427-37.
154. Ahn, J., B.G. Werneburg, and M.D. Tsai, *DNA polymerase beta: structure-fidelity relationship from Pre-steady-state kinetic analyses of all possible correct and incorrect base pairs for wild type and R283A mutant.* Biochemistry, 1997. **36**(5): p. 1100-7.
155. Kuchta, R.D., V. Mizrahi, P.A. Benkovic, K.A. Johnson, and S.J. Benkovic, *Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow).* Biochemistry, 1987. **26**(25): p. 8410-7.
156. Lowe, L.G. and F.P. Guengerich, *Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of dNTP insertion opposite 8-oxo-7,8-dihydroguanine by Escherichia coli polymerases I exo- and II exo.* Biochemistry, 1996. **35**(30): p. 9840-9.
157. Astatke, M., N.D. Grindley, and C.M. Joyce, *How E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) distinguishes between deoxy- and dideoxynucleotides.* J Mol Biol, 1998. **278**(1): p. 147-65.
158. Johnson, S.J., J.S. Taylor, and L.S. Beese, *Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3895-900.
159. Johnson, S.J. and L.S. Beese, *Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase.* Cell, 2004. **116**(6): p. 803-16.
160. Minnick, D.T., K. Bebenek, W.P. Osheroff, R.M. Turner, Jr., M. Astatke, L. Liu, T.A. Kunkel, and C.M. Joyce, *Side chains that influence fidelity at the*

polymerase active site of Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment). J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 3067-75.

161. Alberts, I.L., Y. Wang, and T. Schlick, *DNA polymerase beta catalysis: are different mechanisms possible?* J Am Chem Soc, 2007. **129**(36): p. 11100-10.
162. Radhakrishnan, R., K. Arora, Y. Wang, W.A. Beard, S.H. Wilson, and T. Schlick, *Regulation of DNA repair fidelity by molecular checkpoints: "gates" in DNA polymerase beta's substrate selection.* Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15142-56.
163. Arora, K. and T. Schlick, *Conformational transition pathway of polymerase beta/DNA upon binding correct incoming substrate.* J Phys Chem B, 2005. **109**(11): p. 5358-67.
164. Radhakrishnan, R. and T. Schlick, *Fidelity discrimination in DNA polymerase beta: differing closing profiles for a mismatched (G:A) versus matched (G:C) base pair.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(38): p. 13245-52.
165. Radhakrishnan, R. and T. Schlick, *Orchestration of cooperative events in DNA synthesis and repair mechanism unraveled by transition path sampling of DNA polymerase beta's closing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5970-5.
166. Kunkel, T.A., P.S. Alexander, J.C. Liu, and J.M. Fox, *Mutagenesis in vitro by DNA polymerases alpha, beta and gamma.* Prog Clin Biol Res, 1986. **209A**: p. 441-7.
167. Minnick, D.T., L. Liu, N.D. Grindley, T.A. Kunkel, and C.M. Joyce, *Discrimination against purine-pyrimidine mispairs in the polymerase active site of DNA polymerase I: a structural explanation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1194-9.
168. Patel, P.H., H. Kawate, E. Adman, M. Ashbach, and L.A. Loeb, *A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity.* J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5044-51.
169. Shinkai, A., P.H. Patel, and L.A. Loeb, *The conserved active site motif A of Escherichia coli DNA polymerase I is highly mutable.* J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18836-42.
170. Li, S.X., J.A. Vaccaro, and J.B. Sweasy, *Involvement of phenylalanine 272 of DNA polymerase beta in discriminating between correct and incorrect deoxynucleoside triphosphates.* Biochemistry, 1999. **38**(15): p. 4800-8.
171. Di Pasquale, F., D. Fischer, D. Grohmann, T. Restle, A. Geyer, and A. Marx, *Opposed steric constraints in human DNA polymerase beta and E. coli DNA polymerase I.* J Am Chem Soc, 2008. **130**(32): p. 10748-57.
172. Yang, W., *Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins.* DNA Repair (Amst), 2006. **5**(6): p. 654-66.
173. Ghadessy, F.J., N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, and P. Holliger, *Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution.* Nat Biotechnol, 2004. **22**(6): p. 755-9.
174. Menge, K.L., Z. Hostomsky, B.R. Nodes, G.O. Hudson, S. Rahmati, E.W. Moomaw, R.J. Almassy, and Z. Hostomska, *Structure-function analysis of the mammalian DNA polymerase beta active site: role of aspartic acid 256, arginine*

254, and arginine 258 in nucleotidyl transfer. Biochemistry, 1995. **34**(49): p. 15934-42.

175. Skerra, A., *Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(14): p. 3551-4.
176. Summerer, D., *Die Selektivität der DNA-Replikation: neue Einblicke durch synthetische Sonden und kombinatorisches Protein-Design*. 2004.
177. Kuchner, O. and F.H. Arnold, *Directed evolution of enzyme catalysts.* Trends Biotechnol, 1997. **15**(12): p. 523-30.
178. Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman, *Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the "A rule".* J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13916-22.
179. Efrati, E., G. Tocco, R. Eritja, S.H. Wilson, and M.F. Goodman, *Abasic translesion synthesis by DNA polymerase beta violates the "A-rule". Novel types of nucleotide incorporation by human DNA polymerase beta at an abasic lesion in different sequence contexts.* J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2559-69.
180. Efrati, E., G. Tocco, R. Eritja, S.H. Wilson, and M.F. Goodman, *"Action-at-a-distance" mutagenesis. 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine causes base substitution errors at neighboring template sites when copied by DNA polymerase beta.* J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15920-6.
181. Choi, J.Y. and F.P. Guengerich, *Adduct size limits efficient and error-free bypass across bulky N2-guanine DNA lesions by human DNA polymerase eta.* J Mol Biol, 2005. **352**(1): p. 72-90.
182. Kusumoto, R., C. Masutani, S. Shimmyo, S. Iwai, and F. Hanaoka, *DNA binding properties of human DNA polymerase eta: implications for fidelity and polymerase switching of translesion synthesis.* Genes Cells, 2004. **9**(12): p. 1139-50.
183. Patel, S.S., I. Wong, and K.A. Johnson, *Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant.* Biochemistry, 1991. **30**(2): p. 511-25.
184. Johnson, K.A., *Rapid kinetic analysis of mechanochemical adenosinetriphosphatases.* Methods Enzymol, 1986. **134**: p. 677-705.
185. Werneburg, B.G., J. Ahn, X. Zhong, R.J. Hondal, V.S. Kraynov, and M.D. Tsai, *DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity.* Biochemistry, 1996. **35**(22): p. 7041-50.
186. Singhal, R.K. and S.H. Wilson, *Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive.* J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15906-11.
187. Sweasy, J.B., *Fidelity mechanisms of DNA polymerase beta.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003. **73**: p. 137-69.
188. Taylor, W.R., *The classification of amino acid conservation.* J Theor Biol, 1986. **119**(2): p. 205-18.
189. Juarez, R., J.F. Ruiz, S.A. Nick McElhinny, D. Ramsden, and L. Blanco, *A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(16): p. 4572-82.
190. Nick McElhinny, S.A., J.M. Havener, M. Garcia-Diaz, R. Juarez, K. Bebenek, B.L. Kee, L. Blanco, T.A. Kunkel, and D.A. Ramsden, *A gradient of template*

dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 357-66.

191. Fiala, K.A. and Z. Suo, *Mechanism of DNA polymerization catalyzed by Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV.* Biochemistry, 2004. **43**(7): p. 2116-25.
192. Johnson, A.A., Y. Tsai, S.W. Graves, and K.A. Johnson, *Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization.* Biochemistry, 2000. **39**(7): p. 1702-8.
193. Fleck, O. and P. Schar, *Translesion DNA synthesis: little fingers teach tolerance.* Curr Biol, 2004. **14**(10): p. R389-91.
194. Starcevic, D., S. Dalal, and J. Sweasy, *Hinge residue Ile260 of DNA polymerase beta is important for enzyme activity and fidelity.* Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3775-84.
195. Opresko, P.L., J.B. Sweasy, and K.A. Eckert, *The mutator form of polymerase beta with amino acid substitution at tyrosine 265 in the hinge region displays an increase in both base substitution and frame shift errors.* Biochemistry, 1998. **37**(8): p. 2111-9.
196. Clairmont, C.A., L. Narayanan, K.W. Sun, P.M. Glazer, and J.B. Sweasy, *The Tyr-265-to-Cys mutator mutant of DNA polymerase beta induces a mutator phenotype in mouse LN12 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9580-5.
197. Shah, A.M., S.X. Li, K.S. Anderson, and J.B. Sweasy, *Y265H mutator mutant of DNA polymerase beta. Proper teometric alignment is critical for fidelity.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10824-31.
198. Boule, J.B., F. Rougeon, and C. Papanicolaou, *Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31388-93.
199. Nick McElhinny, S.A. and D.A. Ramsden, *Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2309-15.

7 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Andreas Marx für die außerordentlich nette Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für seine Art, für all die Diskussionen, wissenschaftliche und nicht, für die Unterstützung zu jedem Zeitpunkt meiner Promotion und für alle tolle Möglichkeiten, die mir in seinem Labor zu Verfügung standen, bedanken.

Prof. Dr. Martin Scheffner möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danke, sowie Prof. Dr. Jörg Hartig für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Der ganzen AG MARX möchte ich sagen, dass es eine tolle Zeit war. Die Atmosphäre im Labor werde ich nie vergessen. Ihr seid alle super!!

Meiner Familie, die mir trotz meiner Wanderungen durch Deutschland immer zur Seite steht. *Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, che mi corre sempre dietro nei miei mille traslochi in giro per la Germania.*

Bei Ivan Dikic, Andi und Martin bedanke ich mich besonders herzlich, weil sie mich zu Hans-Peter geführt haben.

Hans-Peter, mein Sonnenschein im Konstanzer Nebel, Du bist mein ein und alles. Diese Arbeit wäre ohne Dich, Deine Unterstützung und Dein Rat nie so geworden, wie sie jetzt ist. Vielen Dank mein Schatzi!!

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weitere Personen, insbesondere Promotionsberater, waren an der inhaltlich materiellen Erstellung dieser Arbeit nicht beteiligt. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Francesca Di Pasquale