

**Untersuchungen zur Fehlerkorrektur bei der DNA-Replikation, der  
DNA-Reparatur und der Okazaki-Fragment-Prozessierung**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Anja Mohrdieck,  
geboren am 21. Dezember 1968

in Itzehoe

Gutachter:

Prof. Dr. F. Große

Prof. Dr. S. Diekmann

Prof. Dr. G. Krauss

Tag der Doktorprüfung: 18.11.2003

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24.11.2003

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Die Genauigkeit der DNA-Replikation</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Die Mechanismen zur Erhaltung der Replikationsgenauigkeit .....	1
1.1.2. Die Genauigkeit der DNA-Reparatur.....	4
<b>1.2. Die DNA-Replikation</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Die Okazaki-Fragment-Prozessierung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Die Basen-Exzisionsreparatur (BER)</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5. Die autonomen 3'-5'-Exonukleasen</b> .....	<b>9</b>
1.5.1. Das Tumorsuppressorprotein P53 (TP53) .....	9
1.5.2. Das Werner Protein (WRN).....	11
1.5.3. Die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1).....	13
<b>1.6. Die 5'-3'-"Flap"-Endonuklease 1 (5'-3'-Exonuklease; FEN1)</b> .....	<b>13</b>
1.6.1. Die enzymatischen Aktivitäten von FEN1 und die FEN1-Protein Interaktionen .....	14
<b>1.7. Das <math>\Phi</math>X174<math>\lambda</math>m16-Reversionssystem</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8. Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Die Chemikalien</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Die Medien</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3. Die Bakterienstämme</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4. Die Bakteriophagen-DNA</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5. Die Plasmide</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6. Die Proteine</b> .....	<b>20</b>
<b>2.7. Die Enzyme</b> .....	<b>21</b>
<b>2.8. Die Replikationsprimer</b> .....	<b>21</b>
<b>2.9. Die Oligonukleotide für die Exo- und Endonukleasetests</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1. Die Expression rekombinanter Proteine</b> .....	<b>24</b>
3.1.1. Die Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 .....	24
3.1.2. Die Reinigung von rekombinantem His-tag FEN1 .....	24

---

<b>3.2. Die Analyse von Proteinen .....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) .....	25
3.2.2. Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	25
3.2.3. Die Coomassie Brilliant Blue Proteinfärbung .....	26
<b>3.3. Die Charakterisierung der Proteine .....</b>	<b>27</b>
3.3.1. Die 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]ATP .....	27
3.3.2. Die 3'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]ddATP .....	28
3.3.3. Die Detektion von 3'-5'-Exonukleaseaktivität .....	28
3.3.4. Die Detektion von 5'-3'-Exonukleaseaktivität .....	29
3.3.5. Die Detektion von 5'-3'-Endonukleaseaktivität .....	29
3.3.6. Die Harnstoff-Polyacrylamidelektrophorese .....	30
<b>3.4. Die Aufreinigung und Analyse von DNA .....</b>	<b>30</b>
3.4.1. Die Präparation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterienzellen (Mandel & Higa, 1970)...	30
3.4.2. Die Transformation von Bakterien.....	31
3.4.3. Die Plasmidaufreinigung mit Qiagen-Säule 100.....	31
3.4.4. Die DNA-Restriktionsanalyse .....	32
3.4.5. Die DNA-Elektrophorese im Agarosegel .....	32
3.4.6. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit mittels UV-Messung...	33
<b>3.5. Die Aufreinigung von einzelsträngiger <math>\Phi</math>X174am16-DNA .....</b>	<b>33</b>
3.5.1. Die Präparation einer Phagenstammlösung.....	33
3.5.2. Die Bestimmung des Phagentiters .....	34
3.5.3. Die Anzucht der Phagen .....	34
3.5.4. Die Isolierung der Phagen im Cäsiumchloridgradienten .....	35
3.5.5. Die Extraktion der DNA aus den Phagen .....	35
<b>3.6. Die Konstruktion eines doppelsträngigen <math>\Phi</math>X174am16-Substrates .....</b>	<b>36</b>
3.6.1. Die <i>in vitro</i> Replikation mit T7-Polymerase .....	36
<b>3.7. Die <i>in vitro</i> Replikation der <math>\Phi</math>X174am16-DNA.....</b>	<b>37</b>
3.7.1. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Polymerase $\alpha$ -Primase .....	38
3.7.2. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Polymerase $\beta$ .....	38
3.7.3. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Polymerase $\delta$ -Holoenzym .....	38
3.7.4. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Klenow Polymerase .....	39
3.7.5. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Klenow $exo^-$ Polymerase .....	39
3.7.6. Die <i>in vitro</i> Replikation mit T4-Polymerase .....	39

---

3.7.7. Die <i>in vitro</i> Replikation mit T7-Polymerase und Sequenase Version 2.0 .....	39
3.7.8. Die <i>in vitro</i> Replikation mit AMV-Reverse Transkriptase .....	39
3.7.9. Die Replikation unter "nucleotide pool bias" Bedingungen .....	40
<b>3.8. Die Variationen der Polymerasereaktionen .....</b>	<b>40</b>
3.8.1. Die Titration von 3'-5'-Exonukleasen zur Polymerasereaktion .....	40
3.8.2. Die Replikation in Anwesenheit von Replikationsprotein A (RPA) .....	41
3.8.3. Die Replikation in Anwesenheit von FEN1 .....	41
<b>3.9. Die Präparation von Sphäroplasten (Benzinger <i>et al.</i>, 1971).....</b>	<b>41</b>
<b>3.10. Die Transfektion der Sphäroplasten.....</b>	<b>42</b>
<b>3.11. Die phänotypische Charakterisierung der Revertanten .....</b>	<b>42</b>
<b>3.12. Die Berechnung der Über-Alles-Genauigkeit und der Fehlerausbeute .....</b>	<b>43</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Die Expression und Reinigung von rekombinantem FEN1 .....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Die Reinigung des Expressionsvektors von FEN1 .....	44
4.1.2. Die Reinigung von FEN1.....	45
<b>4.2. Die Aktivitätstests für Exo- und Endonukleasen.....</b>	<b>45</b>
4.2.1. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von TP53.....	45
4.2.2. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von APE1 .....	46
4.2.3. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von WRN.....	48
4.2.4. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von FEN1 .....	49
4.2.5. Die 5'-3'-Endonukleaseaktivität von FEN1 .....	50
4.2.6. Die 3'-5'-"Proofreading"-Exonuklease von Polymerase $\delta$ .....	52
<b>4.3. Die Gewinnung der <math>\Phi</math>X174am16-DNA-Substrate.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Die Aufreinigung einzelsträngiger $\Phi$ X174am16-DNA.....	54
4.3.2. Die Konstruktion eines doppelsträngigen $\Phi$ X174am16-DNA-Substrats.....	54
4.3.3. Die Sequenzen doppelsträngiger DNA-Substrate.....	55
<b>4.4. Die <i>in vitro</i> Replikation mit Polymerasen.....</b>	<b>56</b>
4.4.1. Die <i>in vitro</i> Replikation von $\Phi$ X174am16-DNA mit Pol $\alpha$ -Prim .....	56
4.4.2. Die <i>in vitro</i> Replikation von $\Phi$ X174am16-DNA mit Pol $\beta$ .....	57
<b>4.5. Die Genauigkeiten verschiedener Polymerasen im <math>\Phi</math>X174am16- Reversionssystem .....</b>	<b>58</b>

---

<b>4.6. Die Genauigkeit von Polymerase <math>\alpha</math>-Primase im <math>\Phi</math>X174<i>am16</i>-Reversionssystem.....</b>	<b>59</b>
<b>4.7. Die Replikationsgenauigkeit von Polymerase <math>\alpha</math>-Primase in Anwesenheit autonomer 3'-5'-Exonukleasen .....</b>	<b>61</b>
4.7.1. Die Genauigkeit von Pol $\alpha$ -Prim nach Titration mit TP53.....	62
4.7.2. Die Genauigkeit von Pol $\alpha$ -Prim nach Zugabe von WRN.....	67
<b>4.8. Die Genauigkeit von Polymerase <math>\beta</math> im <math>\Phi</math>X174<i>am16</i>-Reversionssystem.....</b>	<b>69</b>
<b>4.9. Die Replikationsgenauigkeit von Polymerase <math>\beta</math> in Anwesenheit autonomer 3'-5'-Exonukleasen .....</b>	<b>70</b>
4.9.1. Die Genauigkeit von hPol $\beta$ nach der Titration mit TP53.....	70
4.9.2. Die Genauigkeit von hPol $\beta$ nach der Titration mit hAPE1 .....	73
4.9.3. Die Genauigkeit von hPol $\beta$ nach der Titration mit WRN.....	74
4.9.4. Die Replikationsgenauigkeit von hPol $\beta$ unter "nucleotide pool bias"- Bedingungen in Anwesenheit von TP53 .....	75
<b>4.10. Die Untersuchungen zur Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-         Prozessierung .....</b>	<b>77</b>
4.10.1. Die <i>in vitro</i> Rekonstitution der Okazaki-Fragment-Prozessierung mit Klenow Polymerase .....	79
4.10.2. Die <i>in vitro</i> Rekonstitution der eukaryotischen Okazaki-Fragment Prozessierung mit Pol $\delta$ -Holoenzym .....	84
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>89</b>
<b>5.1. Das <math>\Phi</math>X174<i>am16</i>-Reversionssystem .....</b>	<b>89</b>
5.1.1. Die Genauigkeitsmessungen mit verschiedenen Polymerasen .....	89
5.1.2. Die Genauigkeitserhöhung durch intermolekulare Korrekturleser.....	90
<b>5.2. Die Replikationsgenauigkeit von Pol <math>\alpha</math>-Prim .....</b>	<b>91</b>
5.2.1. TP53 – ein Korrekturleser für Pol $\alpha$ -Prim? .....	91
5.2.2. WRN – ein Korrekturleser für Pol $\alpha$ -Prim? .....	95
<b>5.3. Die Replikationsgenauigkeit von Pol <math>\beta</math> .....</b>	<b>96</b>
5.3.1. Der Einfluss von TP53 und akzessorischer Proteine auf Pol $\beta$ .....	97
5.3.2. Der Einfluss von APE1 und akzessorischer Proteine auf Pol $\beta$ .....	98
5.3.3. Der Einfluss von TP53 auf eine <i>in vitro</i> rekonstituierte "long-patch" BER.....	99

---

5.3.4. Der Einfluss von WRN auf Pol $\beta$ .....	101
5.3.5. Der Einfluss von TP53 auf spezifische Fehlpaarungen bei der Replikation mit Pol $\beta$ .....	102
<b>5.4. Zusammenfassung zum intermolekularem 3'-5'-Korrekturlesen.....</b>	<b>103</b>
<b>5.5. Die Okazaki-Fragment-Prozessierung.....</b>	<b>104</b>
5.5.1. Die funktionelle Interaktion von Klenow Polymerase und hFEN1 .....	104
5.5.2. Die funktionelle Interaktion von hPol $\delta$ -HE mit hFEN1 .....	109
<b>5.6. Ausblick .....</b>	<b>110</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>I-XXIII</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMV-RT	“Avian Myeloblastosis Virus“-Reverse Transkriptase
APE1	Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1
AP-Stelle	Apurinische/Apyrimidinische Stelle in der DNA
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	bovin
BER	Basen-Exzisionsreparatur
Bq	Bequerel
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dna2	Dna2 Helikase / Endonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dRP	Desoxyribose-Phosphat
ddRP	Didehydro-Desoxyribose-Phosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EthBr	Ethidiumbromid
EXO1	Exonuklease 1
FA	Fehlerausbeute
FEN1	“Flap“-Endonuklease 1
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
h	human
HE	Holoenzym
HIV-RT	Humane Immunschwäche Virus-Reverse Transkriptase
His-tag	Histidin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Ka <sup>30</sup>	Kanamycin 30 µg/ml
LB	Luria Bertani (Medium)



---

m	milli
m	murin
M	Molar (mol/Liter)
μ	mikro
MCM2-7	“Minichromosome Maintenance“ proteins 2-7
min	Minute
MMR	Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair)
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
OD	Optische Dichte
8-oxo-A	7,8-Dihydro-8-Oxoadenin
8-oxo-G	7,8-Dihydro-8-Oxoguanin
PA	PA-Medium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	isotonische Phosphat-gepufferte Lösung
PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pol	Polymerase
Prim	Primase
RF	Replikative Form der DNA von Einzelstrangphagen
RFI	gespannt geschlossene, zirkuläre, doppelsträngige DNA
RFII	offen zirkuläre, doppelsträngige DNA
RFIII	lineare, doppelsträngige DNA
RFIV	entspannte, geschlossen zirkuläre, doppelsträngige DNA
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase D	Ribonuklease D
RNase HI	Ribonuklease HI
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat
RPA	Replikationsprotein A, Einzelstrang-Bindeprotein
rpm	Rotation pro Minute
<i>S. cerevisiae, sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSB	“Single Strand Binding Protein“, Einzelstrang-Bindeprotein in <i>E. coli</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
<i>S. pompe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	Tetramethylendiamin

---

TP53	Tumorsuppressorprotein P53
TREX1	“Three prime Repair EXonuclease 1“; DNaseIII
TREX2	“Three prime Repair EXonuclease 2“
Trasyol	Handelsname für Aprotinin (BASF, Ludwigshafen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ts	Temperatursensitivität
U	Unit
üN	über Nacht
ÜR	Überreplikation, “strand displacement“
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WRN	Werner Protein
wt	Wildtyp

## 1. Einleitung

Für alle lebenden Organismen ist es von herausragender Bedeutung, die genomische Integrität aufrecht zu erhalten, sich in organisierter Weise zu entwickeln sowie Zellteilungen und Zelltod zu angemessener Zeit durchzuführen. DNA-Polymerasen sind erforderlich, um die genomische Stabilität bei Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Transläsionen-DNA-Synthese, DNA-Rekombination und Zellzykluskontrolle zu gewährleisten (Shevelev & Hübscher, 2002). Andernfalls können sich Mutationen anreichern, welche die unkontrollierte Zellproliferation und die Ausbildung von Tumoren begünstigen. Die spontane Mutationsrate eukaryotischer Zellen beträgt durchschnittlich  $\leq 10^{-10}$  Mutationen pro Basenpaar und Replikationsvorgang (Kunkel & Bebenek, 2000). Die DNA-Polymerasen synthetisieren die DNA mit einer Fehlerrate von  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  (Shevelev & Hübscher, 2002). Zusätzlich entsteht in einer humanen Zelle täglich durch spontane hydrolytische Depurinierung und Depyridinisierung ein Verlust von ca.  $10^4$  Basen (Nakamura *et al.*, 1998). In Folge dessen entstanden im Verlauf der Evolution verschiedene Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beitragen.

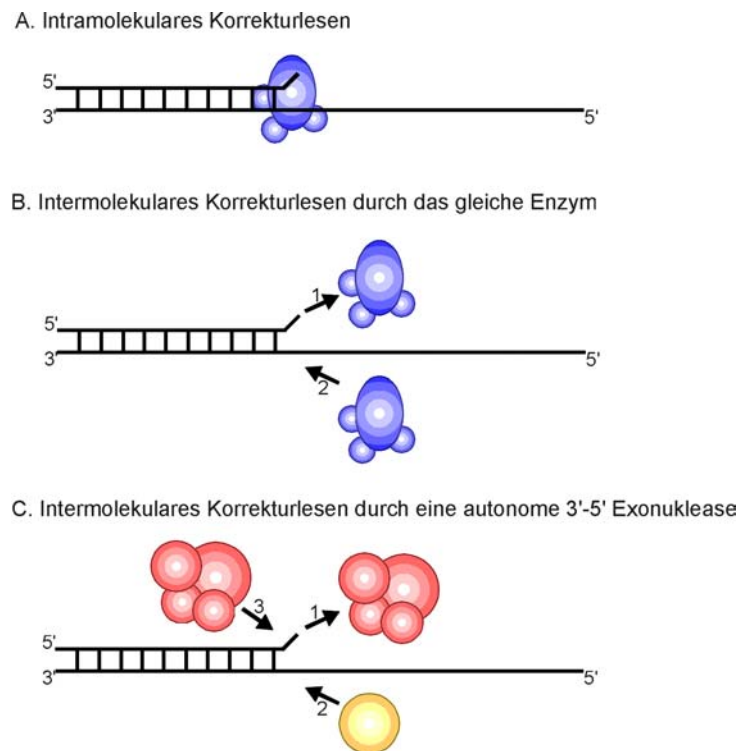
### 1.1 Die Genauigkeit der DNA-Replikation

Die DNA-Replikationsgenauigkeit steht seit vielen Jahren im Mittelpunkt intensiver Forschung. In diesem Kapitel wird auf die Mechanismen zur Erhaltung der Genauigkeit bei der Replikation und Reparatur näher eingegangen.

#### 1.1.1 Die Mechanismen zur Erhaltung der Replikationsgenauigkeit

Eine beeinträchtigte Replikationsgenauigkeit kann zu defekten oder fehlerhaft gefalteten Proteinen und einem anormalen Metabolismus führen. Sie kann auch zur Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten sowie signifikant zu Alterungsprozessen beitragen. Mehrere Faktoren sind für die Aufrechterhaltung der Genauigkeit bei der DNA-Replikation entscheidend. Die annähernd gleich hohe Konzentration aller vier dNTPs begünstigt eine hohe Genauigkeit. Außerdem trägt die komplementäre Basenpaarung nach Watson & Crick (1953) auf Basis der Wasserstoffbrücken-Bindungskräfte mit einer Fehlerrate von  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  pro repliziertem Basenpaar zur Genauigkeit bei. Dies reicht jedoch nicht aus, um die hohe Nukleotidselektivität der Polymerasen zu erklären (Loeb & Kunkel, 1982). Daraufhin wurde das Konzept der "Geometrischen Selektion" und des

“induced fit“ (Goodman, 1997) entwickelt. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Korrekturlesen (“Proofreading“) durch eine intrinsische 3'-5'-Exonuklease (Brutlag & Kornberg, 1972, Kunkel & Soni, 1988), welche die Fehlerhäufigkeit um zwei bis drei Größenordnungen pro Basenpaar senkt (Kornberg & Baker, 1992). Der Prozess des Korrekturlesens lässt sich auf Grund der beteiligten Enzyme in einen intra- und intermolekularen Vorgang gliedern (Abb. 1). Bei intramolekularem Korrekturlesen entfernt die mit der Polymerase assoziierte 3'-5'-Exonuklease die Fehlpaarung prozessiv und das DNA-Substrat bewegt sich bei diesem Prozess zwischen dem aktiven Zentrum der Polymerase und der Exonuklease, ohne dass das Enzym von der DNA dissoziiert. In diesem Modus arbeiten T7-Polymerase (Donlin *et al.*, 1991) und T4-Polymerase (Capson *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1992) (Abb. 1A).



**Abb. 1 : Modell für Intra- und Intermolekulares Korrekturlesen (verändert nach Shevelev & Hübscher, 2002)**

**A.** Intramolekulares Korrekturlesen wird von einem Polymerasemolekül durchgeführt, welches nicht von der DNA dissoziiert. Nach Auftreten eines Fehlers schaltet die Polymerase vom Synthese-Modus in einen Exonuklease-Modus um und entfernt die fehlgepaarte Base.

**B.** Bei intermolekularem Korrekturlesen dissoziiert die fehlerverursachende Polymerase (1) von der DNA und der Fehler wird von der Exonukleaseaktivität eines anderen Polymerasemoleküls entfernt (2). Bei häufigen Assoziations- und Dissoziationsereignissen kann es sich um das identische Molekül handeln.

**C.** Intermolekulares Korrekturlesen könnte auch von einer autonomen 3'-5'-Exonuklease (2) ausgeführt werden. Die Exonuklease bindet die DNA, entfernt die fehlgepaarte Base und das ursprüngliche Polymerasemolekül (1) oder ein anderes (3) setzt die DNA-Synthese fort.

Eine Alternative zum intramolekularen "Proofreading" stellt das intermolekulare Korrekturlesen dar. Die Polymerase dissoziiert nach Einbau der falschen Base und bindet dann erneut mit der 3'-5'-Exonuklease an das fehlgepaarte Primerende und entfernt den Fehler. Dies konnte bei der Klenow Polymerase (Joyce, 1989) beobachtet werden (Abb. 1B). Eine Variante des intermolekularen "Proofreadings" ist die Entfernung einer Fehlpaarung durch eine 3'-5'-Exonuklease, die mit einer andersartigen Polymerase assoziiert ist (Perrino & Loeb, 1990). Genetische Daten aus *S. cerevisiae* deuten daraufhin, dass bei chromosomaler oder Plasmid-DNA-Replikation die mit Pol  $\delta$  und Pol  $\epsilon$  assoziierte 3'-5'-Exonuklease Replikationsfehler auf dem gegenüber liegenden DNA-Strang Korrektur liest (Shcherbakova & Pavlov, 1996; Karthikeyan *et al.*, 2000). Auch die Entfernung einer fehlgepaarten Base durch eine nicht mit einer Polymerase assoziierten, d.h. autonomen 3'-5'-Exonuklease (Perrino & Loeb, 1989) ist möglich (Abb. 1C). Ebenso trägt die verminderte Fähigkeit einer Polymerase, eine Fehlpaarung zu verlängern (Perrino & Loeb, 1989), entscheidend zu einem effektiven Korrekturlesen bei. Die Verlängerung einer Fehlpaarung erfolgt drei bis sechs Größenordnungen langsamer als die einer korrekt gepaarten Base. Außerdem können akzessorische Proteine Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit haben (Kunkel *et al.*, 1994). Die postreplikative Fehlerkorrektur durch verschiedene Fehlerkorrektursysteme (Basen-Exzisionsreparatur, BER; Nukleotid-Exzisionsreparatur, NER und Fehlpaarungsreparatur, MMR; Hoeijmakers, 2001) senkt die Fehlerfrequenz. Diese Fehlerkorrektur steigert die Replikationsgenauigkeit von Hefezellen und humanen Zellen um ein bis zwei Größenordnungen (Kramer *et al.*, 1989; Morrison & Sugino, 1992; Modrich, 1994).

Für Zellen, denen eine mit der Polymerase assoziierte 3'-5'-Exonuklease fehlt, wurden Mutatorphänotypen beschrieben. Diese haben bei Vielzellern das Potenzial zur Tumorentstehung (Loeb, 1991; Jackson & Loeb, 1998). Der Verlust des Korrekturlesens der replikativen Polymerase ist in *E. coli* letal (Fijalkowska & Schaaper, 1996), führt in Kombination mit Defekten bei der Fehlpaarungsreparatur (MMR) bei *S. cerevisiae* zu starken Mutatorphänotypen (Morrison *et al.*, 1993; Morrison & Sugino, 1994; Vanderstraeten *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 1999) und ruft bei Mäusen Krebs hervor (Goldsby *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2002). Außerdem führt die Anhäufung von Mutationen zu vorzeitiger Alterung (Morley, 1995).

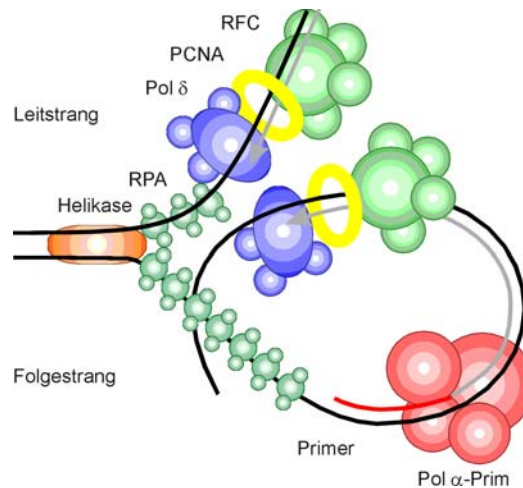
### 1.1.2 Die Genauigkeit der DNA-Reparatur

Fehler können bei jeder DNA-Synthesereaktion in der Zelle entstehen, einschließlich der Reparatursynthese bei der Basen-Exzisionsreparatur (BER), der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und der Fehlpaarungsreparatur (MMR). Diese Reparaturprozesse sind in ihrem Umfang sehr verschieden und werden von unterschiedlichen DNA-Polymerasen mit deutlich unterschiedlichen Fehlerraten katalysiert. Akkurate Reparaturen sind insbesondere in Stammzellen zur Erhaltung der genomischen Integrität unbedingt erforderlich.

Schätzungen geben an, dass in einer humanen Zelle täglich  $10^4$  bis  $10^6$  Nukleotide (Holmquist, 1998) geschädigt werden. Die Schäden resultieren aus normalen chemischen Reaktionen, wie der Depurinierung, Desaminierung, Oxidation und Methylierung (Kunkel, 1999). Viele dieser DNA-Schäden werden durch Exzision der geschädigten Base und Resynthese durch Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) ersetzt ("short-patch" BER). Pol  $\beta$  besitzt keine intrinsische 3'-5'-Exonuklease (Tanabe *et al.*, 1979) und repliziert DNA mit einer hohen Fehlerrate. Die durchschnittliche Fehlerrate der Basensubstitution beträgt ca.  $10^{-3}$  (Osheroff *et al.*, 1999; Beard *et al.*, 1996). Wenn diese Fehlerrate auch *in vivo* bei der BER von ca. 10.000 Fehlern auftreten würde, würden etwa 10 Fehler pro Tag in einer Zelle entstehen. Allerdings könnte die Genauigkeit eines vollständigen BER-Komplexes höher sein, als die der Pol  $\beta$  allein. Eine Alternative wäre ein mögliches Korrekturlesen für die Pol  $\beta$  durch eine externe 3'-5'-Exonuklease (Höss *et al.*, 1999; Mazur & Perrino, 1999; Chou & Cheng, 2002) oder eine anschließende MMR.

## 1.2 Die DNA-Replikation

Die Replikation der zwei DNA-Matrizenstränge an der Replikationsgabel eukaryotischer Zellen ist ein präzise koordinierter Prozess, der die akkurate und effiziente Verdopplung des Genoms gewährleistet (Waga & Stillman, 1998; Hübscher *et al.*, 2002; Abb. 2). In die Replikation der DNA sind eine Vielzahl von Proteinen in den sog. Replikationskomplexen (Replisomen) involviert: Allein an der Synthese des Folgestrangs sind mindestens 23 Polypeptide beteiligt (Hübscher & Seo, 2001).



**Abb. 2 : Modell einer eukaryotischen DNA-Replikationsgabel (nach Shevelev & Hübscher, 2002)**

Die doppelsträngige DNA wird von einer Helikase entwunden und die entstehenden einzelsträngigen DNA-Abschnitte von RPA stabilisiert. Der oben dargestellte Leitstrang wird ausgehend von einem Primer im Replikationsursprung kontinuierlich vom Pol  $\delta$ -Holoenzym (aus Pol  $\delta$ , PCNA und RFC bestehend) verlängert. Auf dem Folgestrang werden diskontinuierlich Okazaki-Fragmente gebildet, deren RNA-Primer (ca. 10 Ribonukleotide) und die folgenden ca. 20-30 DNA-Nukleotide von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisiert werden. Nach dem "Polymerase-switch" verlängert Pol  $\delta$ -Holoenzym die Okazaki-Fragmente auf ca. 200 Nukleotide.

Eine Helikase (MCM2-7-Komplex oder eine andere DNA-Helikase) entwindet die dsDNA am Replikationsursprung. Die entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche werden von RPA gebunden und stabilisiert. RPA unterstützt auch die Entwindung der DNA durch seine Entwindungsaktivität und möglicherweise durch die Interaktion mit der Helikase und Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim). Die Pol  $\alpha$ -Prim assoziiert mit dem Initiations-Komplex am DNA-Replikationsursprung (Bell & Dutta, 2002). Sie ist als einziges Enzym fähig, die DNA-Synthese *de novo* durch Synthese eines RNA-Primers zu initiieren und dann durch Polymerisation eines kurzen DNA-Stücks zu verlängern (RNA-DNA-Primer) (Wang, 1996). Der RNA-DNA-Primer umfasst eine Länge von ca. 40 Nukleotiden, wobei ca. 10 Ribonukleotide auf die RNA entfallen (Salas *et al.*, 1996). Die Pol  $\alpha$ -Prim ist ein moderat prozessives Enzym, das nach Bildung des Primers von der DNA dissoziiert (Murakami & Hurwitz, 1993). Der Primer wird von der hoch prozessiven Pol  $\delta$  oder Pol  $\epsilon$  kontinuierlich auf dem Leitstrang und diskontinuierlich auf dem Folgestrang elongiert (Waga *et al.*, 1994). Das RFC-Heteropentamer verdrängt die Pol  $\alpha$ -Prim vom Primer (Maga *et al.*, 2000) und lädt unter ATP-Hydrolyse das ringartige homotrimere PCNA auf die DNA an Primer / Matrize-Übergänge oder an einen Einzelstrangbruch in der dsDNA (Tsurimoto & Stillman, 1991). Dieser sog. "Polymeraseswitch" ist ein von RFC katalysierter, hoch koordinierter

Prozess und beinhaltet ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein Interaktionen zwischen Pol  $\alpha$ -Prim, Pol  $\delta$ , RFC, PCNA und RPA. Das PCNA funktioniert als Polymeraseklammer und Prozessivitätsfaktor für Pol  $\delta$  und Pol  $\epsilon$  (Prelich *et al.*, 1987; Bauer & Burgers, 1988). PCNA interagiert mit ca. 30 weiteren Proteinen, die am DNA-Metabolismus beteiligt sind (Tsurimoto, 1999; Warbrick, 2000). Nach vollendeter DNA-Synthese und erfolgter Prozessierung der auf dem Folgestrang synthetisierten Okazaki-Fragmente verknüpft Ligase I die DNA-Stränge miteinander.

Pol  $\alpha$ -Prim ist ein heterotetrameres Enzym. Die große Untereinheit p180 besitzt die katalytische Polymeraseaktivität, während die beiden kleinen Untereinheiten (p58, p48) die Primaseaktivität auf sich vereinen (Frick & Richardson, 2001). Die p68-Untereinheit besitzt keine katalytische Aktivität; sie wird zellzyklusabhängig phosphoryliert und spielt vermutlich eine regulatorische Rolle (Mizuno *et al.*, 1999). Pol  $\alpha$ -Prim besitzt keine korrekturlesende 3'-5'-Exonuklease (Roberts & Kunkel, 1996). Außerdem dissoziiert Pol  $\alpha$ -Prim schnell von einem fehlgepaarten Primer-Terminus und bindet neuerlich nur sehr schwach an dieses fehlgepaarte Ende (Kornberg & Baker, 1992).

Pol  $\delta$  ist in Säugern ein heterotetrameres (p125, p66, p50, p12; Hughes *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000), in *S. pombe* ein heteropentameres (p125, p55, p54, p40, p22; Zuo *et al.*, 1997) und in *S. cerevisiae* ein heterotrimeres Enzym (p125, p58, p55; Burgers & Gerik, 1998). Auf der großen Untereinheit dieses multimeren Enzyms sind die aktiven Zentren einer Polymerase und einer 3'-5'-Korrekturxonuklease lokalisiert (Lee *et al.*, 1991). Die kleinen Untereinheiten spielen sowohl bei Protein-Protein Interaktionen als auch bei der Zellzyklusregulation eine Rolle für die Stabilisierung der katalytischen Untereinheit.

### 1.3 Die Okazaki-Fragment-Prozessierung

Die korrekte Entfernung der RNA-Primer der Okazaki-Fragmente ist von herausragender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Dieser Prozess kann *in vitro* durch das gemeinsame Agieren der Nukleasen RNase HI und FEN1 erfolgen (Bambara *et al.*, 1997; Waga & Stillman, 1998). Allerdings zeigten genetische Analysen in Hefe, dass weder RNase HI noch FEN1 essenziell für die Zelle sind und dass auch Doppelmutanten lebensfähig sind (Reagan *et al.*, 1995; Sommers *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde die Beteiligung eines



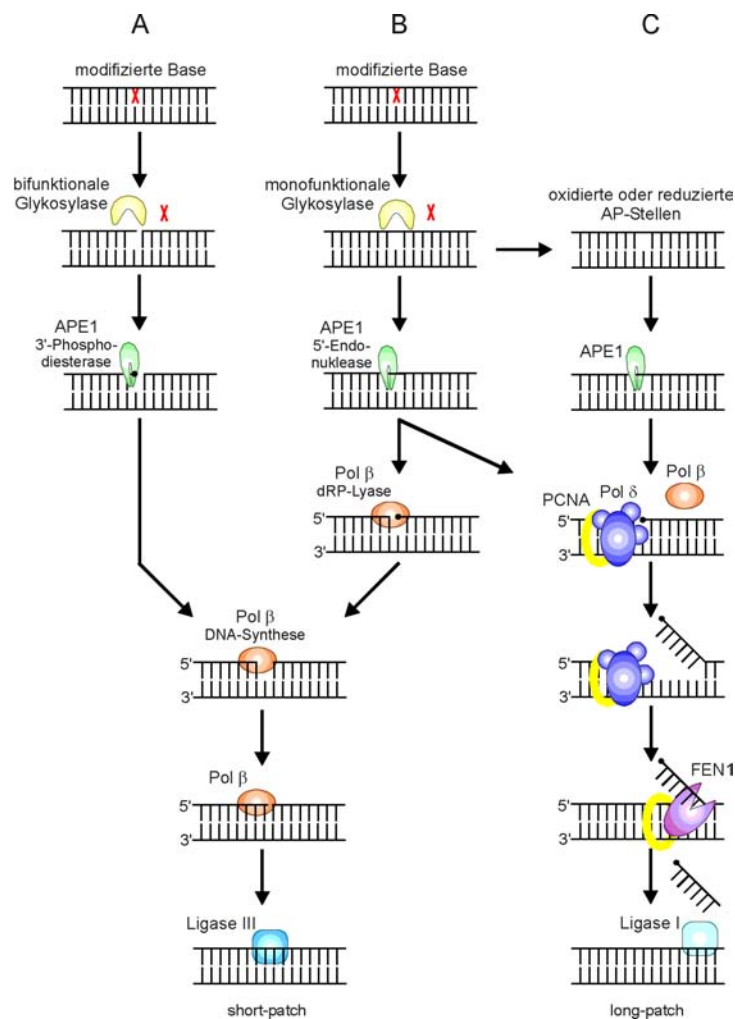
weiteren Faktors in der Okazaki-Fragment Prozessierung vermutet. Die Entdeckung von Dna2 in Hefe mit einer schwachen 5'-3'-Helikaseaktivität und einer intrinsischen einzelstrang-spezifischen 5'-3'-Endonukleaseaktivität (Bae *et al.*, 1998), die essenziell für die Zelle ist (Lee *et al.*, 2000), führte zur Entwicklung eines neuen Modells. Dieses Modell (Bae & Seo, 2000; Bae *et al.*, 2001) beschreibt, wie Pol  $\delta$ -Holoenzym nach Erreichen des 5'-Endes des RNA-Primers diesen verdrängt und die sog. "strand displacement"-Synthese fortsetzt, bis ein einzelsträngiger Bereich von ca. 30-35 Nukleotiden entstanden ist, an den RPA bindet. RPA rekrutiert Dna2, welches die einzelsträngige DNA einschneidet, so dass nur noch 5-7 ungepaarte Nukleotide ("flap") zurückbleiben. Dna2 und RPA dissoziieren und die 5'-3'-Endonuklease FEN1 entfernt die "flap"-DNA, so dass eine dsDNA mit einem Strangbruch entsteht, der von Ligase I geschlossen wird.

#### 1.4 Die Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Die häufigsten DNA-Schäden betreffen die Basen. Es entstehen täglich  $10^4$ - $10^5$  Basenmodifikationen. Der vorherrschende Weg, die DNA-Sequenz wiederherzustellen, ist die Basen-Exzisionsreparatur (Lindahl, 1993; Parikh *et al.*, 1997).

Eine bifunktionale Glykosylase schneidet nach Entfernen der modifizierten Base die DNA auf der 3'-Seite der apurinischen Stelle (AP-Stelle) ein, so dass eine ein Nukleotid umfassende Lücke mit einem 3'-Didehydro-Didesoxyribose-Phosphat (3-ddRP) und einem 5'-Phosphat-Ende entsteht. Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) entfernt mit seiner 3'-Phosphodiesterase-Aktivität das 3'-ddRP und erzeugt so eine 3'-OH-Gruppe (Parikh *et al.*, 1999), die von Pol  $\beta$  durch den Einbau eines Nukleotids verlängert wird. Ligase III verknüpft die DNA-Enden ("short-patch" BER, Abb. 3A). Monofunktionale Glykosylasen entfernen modifizierte Basen, so dass eine AP-Stelle entsteht. APE1 schneidet an der 5'-Seite der AP-Stelle die DNA ein und es entsteht ein 3'-OH-Ende und ein 5'-Desoxyribose-Phosphat (5'-dRP) (Klungland & Lindahl, 1997). Nun kann sich eine "short-patch" oder "long-patch" BER anschließen (Fortini *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1996). Bei ersterer (Abb. 3B) wird das 5'-Ende von der dRP-Lyase-Aktivität der Pol  $\beta$  prozessiert. Pol  $\beta$  inseriert ein Nukleotid und Ligase III / XRCC1 schließt die Lücke (Cappelli *et al.*, 1997). Bei der "long-patch" BER (Abb. 3C) synthetisieren Pol  $\delta/\epsilon$  (Matsumoto *et al.*, 1999; Pascucci *et al.*, 1999) und / oder nach neueren Erkenntnissen auch Pol  $\beta$  (Dianov *et al.*, 1999a; Prasad *et al.*, 2000; Podlutzky

*et al.*, 2001a) in Anwesenheit von PCNA und RFC 2-8 Nukleotide und verdrängen dabei das 5'-Ende von der DNA ("strand displacement"-Synthese). PCNA stimuliert die Fähigkeit von FEN1, den verdrängten DNA-Einzelstrang einzuschneiden und so die 5'dRP-Gruppe zu entfernen (Klungland & Lindahl, 1997; Gary *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Pascucci *et al.*, 1999). DNA-Ligase I als Interaktionspartner von PCNA schließt die Lücke in der DNA (Levin *et al.*, 1997). Fast alle Komponenten der BER (mit Ausnahme der Glykosylasen) interagieren mit APE1 und bilden transiente Komplexe aus (Mitra *et al.*, 2001).



**Abb. 3 : Modell der "short-patch" und "long-patch" Basen-Exzisionsreparatur (verändert nach Nilsen & Krokan, 2001).**

Die BER wird von Glykosylasen initiiert und erfolgt im "short-patch" (A; B) oder dem "long-patch" (C) Modus (für Details siehe Text).

Pol β ist ein 39 kDa Protein mit 335 Aminosäuren (AS). Es gliedert sich in eine 31 kDa Domäne mit der Polymeraseaktivität und in eine N-terminale 8 kDa Domäne mit der dRP-Lyase-Aktivität (Matsumoto & Kim, 1995; Prasad *et al.*, 1998). Pol β besitzt keine

3'-5'-Exonukleaseaktivität (Tanabe *et al.*, 1979) und ist vorwiegend in der BER involviert, spielt aber auch eine Rolle in der Meiose und Doppelstrangbruch-Reparatur (Idriss *et al.*, 2002).

## 1.5 Die autonomen 3'-5'-Exonukleasen

Um als autonome 3'-5'-"Proofreading"-Exonuklease arbeiten zu können, sollte eine Exonuklease folgende Anforderungen erfüllen (Kunkel, 1988): Sie sollte unidirektional und nicht-prozessiv am 3'-Ende des DNA-Substrats arbeiten. Sie setzt auf ssDNA dNMPs als optimales Substrat frei und entfernt bevorzugt ein fehlgepaartes Primerende. Außerdem interagiert die Exonuklease funktionell mit der Polymerase zur Erhöhung der Genauigkeit der DNA-Synthese. Dabei ist eine distributive Hydrolyse inkorrekturer Basen erforderlich, damit die sofortige Elongation des Primers nach Entfernung des Fehlers wieder einsetzen kann. Dies unterscheidet den Vorgang von der prozessiven Hydrolyse einzelsträngiger DNA bei DNA-Reparatur und Rekombination.

In den letzten Jahren ist eine zunehmende Zahl von autonomen humanen 3'-5'-Exonukleasen identifiziert worden. Dazu gehören das Tumorsuppressorprotein P53 (TP53), das Werner-Protein (WRN), die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease1 (APE1), TREX1 (DNase III) und TREX2 (Mazur & Perrino, 1999; Höss *et al.*, 1999; Mazur & Perrino, 2001), MRE11 (Trujillo *et al.*, 1998), hRAD1 (Parker *et al.*, 1998) und hRAD9 (Bessho & Sancar, 2000). Demgegenüber stehen bisher erst zwei identifizierte humane 5'-3'-Exonukleasen, Flap-Endonuklease1 (FEN1) und Exonuklease 1 (EXO1) (Qiu *et al.*, 1999; Lee & Wilson, 1999). Die Funktion der 3'-5'-Exonukleaseaktivität von TP53, WRN, TREX1, TREX2, hRAD1, hRAD9 ist noch unbekannt (Shevelev & Hübscher, 2002). MRE11 spielt eine Rolle bei rekombinativen Prozessen der Doppelstrangbruch-Reparatur (Paull & Gellert, 2000).

### 1.5.1 Das Tumorsuppressorprotein P53 (TP53)

Das Tumorsuppressorprotein P53 wurde 1979 erstmals beschrieben und ursprünglich als Onkogen klassifiziert und später als Tumorsuppressor reklassifiziert (May & May, 1999). Es ist eines der am stärksten untersuchten Proteine in der Krebsforschung. Die Bedeutung ergibt sich aus dem Befund, dass 50 % aller humanen Tumore eine Mutation im Gen des Tumorsuppressorproteins P53 (*TP53*) aufweisen und es damit das am häufigsten mutierte einzelne Gen in Tumoren ist (Vogelstein & Kinzler, 1992; Soussi *et al.*, 1994). DNA-Schäden führen zur Aktivierung und Akkumulation des TP53 (Kastan

*et al.*; 1991; Fritsche *et al.*, 1993; Nelson & Kastan, 1994). In seiner aktivierten Form arbeitet TP53 als Transkriptionsfaktor und vermittelt die Expression einer Vielzahl von Genen (El-Deiry, 1998) die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren. Die Reparatur der geschädigten DNA während des Zellzyklusarrests oder der programmierte Zelltod verhindern eine Fixierung der DNA-Schäden als Mutationen im Genom. Auf diese Weise trägt TP53 zur Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms bei und wird auch als "guardian of the genome" (Lane, 1992) bezeichnet.

### **1.5.1.1 Die TP53-assoziierte Exonuklease**

Als enzymatische Aktivität beschrieben Mummenbrauer *et al.* (1996) für TP53 eine intrinsische Exonukleaseaktivität auf ssDNA mit einer 3'-5'-Polarität. Die Exonukleaseaktivität des Wildtyp-TP53 ist auf der Kern-Domäne lokalisiert und  $Mg^{2+}$ -abhängig. Eine weitere Charakterisierung der Substratspezifität der Exonuklease des TP53 (Skalski *et al.* 2000a) zeigt, dass im Vergleich Nukleotide von ssDNA dreifach schneller abgebaut werden als von dsDNA. Außerdem bevorzugt TP53 in einer Duplex-DNA eine einzelne 3'-terminale Fehlpaarung verglichen mit der korrekten Basenpaarung und entfernt auch Nukleotide vom 3'-Ende glatter und überhängender DNA-Doppelstrangbrüche effektiv. Auf Matrize / Primer-Substraten, mit Primern bis zu 17 Nukleotiden Länge arbeitet die Exonuklease überwiegend nicht-prozessiv, hingegen prozessiv mit Primern länger als 30 Nukleotide.

Der monoklonale Antikörper PAb421, der ein C-terminales Epitop des TP53 erkennt, inhibiert die Exonuklease bei gleichzeitig aktivierter sequenzspezifischer DNA-Bindung des TP53 (Janus *et al.*, 1999). Die beiden Aktivitäten der Kern-Domäne, die sequenzspezifische DNA-Bindung und die 3'-5'-Exonuklease, werden vermutlich gegenläufig reguliert. Eine aktuelle Untersuchung zeigt, dass in einer natürlich vorkommenden C-terminal alternativ gespleißten Form des murinen TP53 die sequenzspezifische DNA-Bindung und die 3'-5'-Exonuklease gleichzeitig aktiv sind (Shakkeed *et al.*, 2002).

### **1.5.1.2 Die Rolle von TP53 in Replikation und Reparatur**

TP53 ist durch Interaktionen mit essenziellen Reparaturproteinen in die DNA-Reparatur involviert (Wang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Offer *et al.*, 1999; Therrien *et al.*, 1999). Außerdem kolokalisiert TP53 mit der DNA-Replikationsmaschinerie (Gannon & Lane, 1987; Cox *et al.*, 1995) und ist vermutlich direkt an der zellulären DNA-Replikation

(Wilcock & Lane, 1991) beteiligt. Für in der S-Phase befindliche Zellen wurde eine Kolokalisation von TP53 mit der DNA-Syntheseaktivität nachgewiesen (Huang, 1998). Des Weiteren spielt TP53 bei Rekombinationsereignissen eine Rolle (Stürzbecher *et al.*, 1996; Wiesmüller *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997, Søe *et al.*, 2002, Stephan *et al.*, 2002). Auch direkte Protein-Protein Interaktionen von TP53 zu Enzymen der Replikation und Reparatur sind bereits nachgewiesen worden. So bindet das Einzelstrang-Bindeprotein RPA an TP53 (Dutta *et al.*, 1993). Mittels einer biophysikalischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass TP53 *in vitro* an Pol  $\alpha$ -Prim bindet (Kühn *et al.*, 1999). Außerdem interagiert TP53 mit Pol  $\beta$  und ist verantwortlich für einen Anstieg der BER-Aktivität (Zhou *et al.*, 2001). Ein weiteres Protein der BER, die APE1, aktiviert die Bindung von TP53 an spezifische DNA *in vitro* (Jayaraman *et al.*, 1997). Des Weiteren assoziieren APE1 und TP53 auch *in vivo* (Gaiddon *et al.*, 1999).

Da weder Pol  $\alpha$ -Prim noch Pol  $\beta$  eine intrinsische Korrektorexonuklease besitzen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass TP53 diese Funktion ausfüllen könnte (Huang, 1998; Zhou *et al.*, 2001; Melle & Nasheuer, 2002; Ballal *et al.*, 2002). Diese Möglichkeit wird von dem Befund unterstützt, dass beispielsweise viele Präparationen von Pol  $\alpha$ -Prim beschrieben wurden, die mit einer Exonukleaseaktivität assoziiert waren (Chen *et al.*, 1979; Ottiger & Hübscher, 1984; Bialek *et al.*, 1989).

## 1.5.2 Das Werner Protein (WRN)

Das Werner-Syndrom ist die erste erbliche Humanerkrankung, die von einem dysfunktionalem Protein (Werner Protein, WRN) mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität verursacht wird. Das Werner Syndrom ist eine seltene, autosomal, rezessive Humanerkrankung, die durch vorzeitige Alterung (Salk, 1982, Martin *et al.*, 1999) und genomische Instabilität (Salk *et al.*, 1981) charakterisiert ist.

Das Werner Protein (1432 Aminosäuren; Yu *et al.*, 1996) vereinigt drei enzymatische Eigenschaften auf sich: eine 3'-5'-Helikaseaktivität (Gray *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998a), eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und eine ATPase-Aktivität (Gray *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997).

### 1.5.2.1 Die WRN-assoziierte 3'-5'-Exonuklease

Auf Grund der Analyse von Sequenzhomologien ist für WRN eine am N-Terminus lokalisierte Exonukleaseaktivität vermutet worden, da sich dort die drei konservierten

Motive, die denen der *E. coli* RNase D und der korrekturlesenden Exonuklease der *E. coli* Polymerase I ähneln, befinden (Moser *et al.*, 1997; Mushegian *et al.*, 1997). Diese Vorhersage wurde für rekombinantes humanes WRN durch den Nachweis einer 3'-5'-Exonuklease (Huang *et al.*, 1998; Kamath-Loeb *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998a) oder kontrovers einer 5'-3' Exonuklease (Suzuki *et al.*, 1999) bestätigt.

Die WRN 3'-5'-Exonuklease ist ein dsDNA abhängiges Enzym. Als Substrat dient ein rezessives 3'-Ende (bzw. ein 5'-Überhang) als DNA-Terminus einer dsDNA. Doppelsträngige DNA mit glatten Enden und ssDNA werden nicht abgebaut. Bevorzugt wird ein fehlgepaartes terminales Nukleotid an einem rezessiven 3'-Ende entfernt, wohingegen zwei fehlgepaarte terminale Basen nicht abgebaut werden (Kamath-Loeb *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Die WRN Exonuklease entfernt auch ein terminales Nukleotid, das eine 3'-PO<sub>4</sub>-Gruppe besitzt (Kamath-Loeb *et al.*, 1998). Gehemmt wird die Exonuklease von 3'-terminalen oxidativen Schäden der DNA wie z.B. 8-oxo-G und 8-oxo-A (Machwe *et al.*, 2000).

### 1.5.2.2 Die WRN-Protein Interaktionen

WRN interagiert physikalisch und / oder funktionell mit Proteinen, die an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem Pol  $\delta$  (Szekely *et al.*, 2000), Pol  $\beta$  (Harrigan *et al.*, 2003), RPA (Brosh *et al.*, 1999), PCNA (Lebel *et al.*, 1999), Ku86/70 (Cooper *et al.*, 2000; Li & Comai, 2000), Topoisomerase I (Lebel *et al.*, 1999) sowie FEN1 (Brosh *et al.*, 2001), PARP1 (Lebel *et al.*, 2003) und TP53 (Blander *et al.*, 1999; Spillare *et al.*, 1999).

WRN steigert in Abwesenheit von PCNA die Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus von Pol  $\delta$  (Kamath-Loeb *et al.*, 2000). Außerdem stimuliert WRN die "strand displacement"-Synthese der Pol  $\beta$  (Harrigan *et al.*, 2003). Der in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen involvierte Ku86/70-Komplex (Featherstone und Jackson, 1999) steigert die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von WRN dramatisch (Cooper *et al.*, 2000; Li & Comai, 2000). So wird das WRN-Protein stimuliert, ansonsten inerte DNA Substrate, wie ssDNA und dsDNA mit glatten Enden oder 3'-Überhang abzubauen (Li & Comai, 2000, 2001). RPA stimuliert die Helikaseaktivität von WRN (Shen *et al.*, 1998b; Brosh *et al.*, 1999). Auf Grund der Exonukleaseaktivität sowie der beschriebenen WRN-Protein Wechselwirkungen mit an der Replikation und Reparatur beteiligten Proteine lässt sich

spekulieren, dass WRN als 3'-5'-Korrekturleser einen direkten Einfluss auf die genomische Stabilität ausüben könnte.

### **1.5.3 Die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1)**

Humane APE1 (Demple *et al.*, 1991) wird auch als HAP1 (Robson *et al.*, 1992) REF1 (Xanthoudakis & Curran, 1992) und APEX1 (Seki *et al.*, 1991) bezeichnet. Es wird wegen seiner Homologie zu den *E. coli* Endonukleasen zur Familie der Exonuklease III gerechnet.

#### **1.5.3.1 Die enzymatischen Aktivitäten von APE1**

APE1 ist ein 36,5 kDa großes Protein aus 318 Aminosäuren, das in zwei Domänen gegliedert ist (Seki *et al.*, 1992). Die AP-Endonuklease-, die 3'-Phosphodiesterase- und die 3'-Phosphataseaktivität dieses multifunktionalen Enzyms sind in der C-terminalen Region lokalisiert (Evans *et al.*, 2000). Eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität wurde als biologisch nicht signifikant eingestuft, da sie 2-4 Größenordnungen weniger aktiv war als die der Endonuklease (Demple *et al.*, 1991; Robson *et al.*, 1991). Aber kürzlich zeigten Studien, dass APE1 eine exonukleolytische Aktivität besitzt, die das Antitumor-Nukleosid-Analogon  $\beta$ -L-Dioxolan-Cytidin vom 3'-Ende einer Duplex-DNA entfernt (Chou *et al.*, 2000). Die N-terminale Domäne ist essenziell für die Redoxaktivität (Xanthoudakis *et al.*, 1994), welche die Aktivität von Transkriptionsfaktoren stimuliert.

#### **1.5.3.2 Die APE1-Protein Interaktionen in der BER**

APE1 interagiert mit vielen an der BER beteiligten Enzymen und ist so in der Lage, den Ablauf des Reparaturprozesses zu koordinieren (Mol *et al.*, 2000). An eine AP-Stelle gebundenes APE1 interagiert mit Pol  $\beta$  (Bennett *et al.*, 1997). Außerdem bildet APE1 binäre Komplexe mit PCNA und FEN1 und stimuliert die spezifische Aktivität von FEN1 (Mitra *et al.*, 2001). Da Pol  $\beta$  keine intrinsische Korrektur exonuklease besitzt wurde die Hypothese aufgestellt, dass APE1 mit seiner 3'-5'-Exonukleaseaktivität diese Funktion ausfüllen könnte (Chou & Cheng, 2002).

### **1.6 Die 5'-3'-"Flap"-Endonuklease 1 (5'-3'-Exonuklease; FEN1)**

FEN1-Proteine sind strukturspezifische 5'-3'-Nukleasen und prozessieren eine Vielzahl verschiedener RNA- und DNA-Substrate. Sie sind an der DNA-Reparatur und der

Okazaki-Fragment-Prozessierung beteiligt (Kim *et al.*, 1998; Gary *et al.*, 1999; Pascucci *et al.*, 1999; Alleva *et al.*, 2000; Alleva & Doetsch, 2000, Maga *et al.*, 2001b; Bae *et al.*, 2001). Ihre wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität macht es wahrscheinlich, dass sie zu einem frühen Zeitpunkt der zellulären Entwicklung entstanden sind (Sun *et al.*, 2002). 5'-"Flap"-Endonukleasen sind sowohl in Viren und Archaeobakterien als auch in Pro- und Eukaryoten gefunden worden. Im Gegensatz zu FEN1-Homologen aus Eukaryoten, sind die prokaryotischen 5'-3'-Exonukleasen im N-Terminus einer Polymerase lokalisiert, am besten charakterisiert am Beispiel der 5'-3'-Exonukleasedomäne von *E. coli* Pol I (Lyamichev *et al.*, 1993).

### 1.6.1 Die enzymatischen Aktivitäten von FEN1 und die FEN1-Protein Interaktionen

FEN1 vereint zwei enzymatische Eigenschaften in sich, eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität (Lindahl, 1971; Harrington & Lieber, 1994; Murante *et al.*, 1994; Alleva & Doetsch, 1998) und eine 5'-3'-Endonukleaseaktivität (Harrington & Lieber, 1994; Kaiser *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2001; Ranalli *et al.*, 2002). Bisher wurden für FEN1 mehrere Interaktionspartner, die am DNA-Metabolismus beteiligt sind, beschrieben: PCNA, APE1, Dna2-Helikase, WRN, RPA, Pol  $\alpha$ , Pol  $\beta$ , und Pol  $\epsilon$  (Biswas *et al.*, 1997; Brosh *et al.*, 2002; Budd & Campbell, 1997; Dianova *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 2000; Siegal *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1997). Das Verständnis der biochemischen Funktionen und funktionellen Wechselwirkungen führte zu wachsendem Verständnis der *in vivo* Mechanismen von verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. der Basen-Exzisionsreparatur und der Okazaki-Fragment-Prozessierung. Die Fähigkeit von FEN1, unterschiedliche RNA- und DNA-Substrate abzubauen, eröffnet die Möglichkeit, DNA zu entfernen, die sich an den RNA-Primer anschließt. Wenn der Primer nur mit geringer Genauigkeit verlängert wurde, könnte FEN1 auf diese Weise zur Erhöhung der Replikationsgenauigkeit beitragen (Bhagwat & Nossal, 2001). Der relative Beitrag von Exo- und Endonukleaseaktivität von FEN1 schwankt vermutlich zwischen den verschiedenen Spezies (Alleva & Doetsch, 2000).

### 1.7 Das $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem

Die Replikationsgenauigkeit von Polymerasen kann mit dem  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem bestimmt werden. Die zirkuläre einzelsträngige DNA des  $\Phi$ X174 $am$ 16-Phagen besteht aus 5386 Nukleotiden und umfasst neun Gene. Das Amber16-Stoppocodon



(TAG) befindet sich in einer Region des Phagengenoms, in dem die für den Phagen essenziellen Gene A und B lokalisiert sind (Abb. 4).



**Abb. 4 : Die Sequenzanordnung der Gene A und B des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 $am$ 16 im Bereich des Amber-Codons**

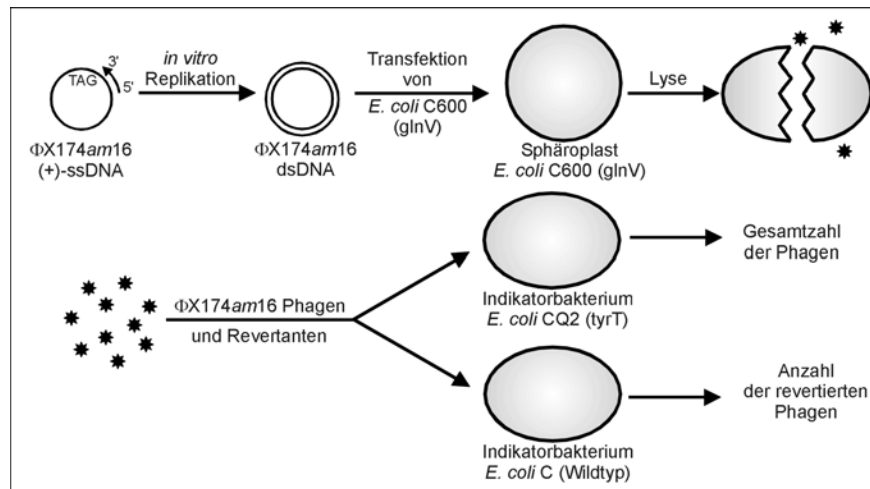
Das Amber-Codon (TAG) befindet sich an Position Gen AB 5276-5278 im (+)-Strang des einzelsträngigen Phagengenoms.

Jeder Nukleotidaustausch innerhalb des Amber-Codons führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz in mindestens einem der beiden Genprodukte. Von neun möglichen Basentauschen verursachen dabei sieben phänotypische Veränderungen (Fersht & Knill-Jones, 1981, 1983). Diese Veränderungen manifestieren sich in einer Temperatursensitivität (zusammengefasst in Tab. 1).

**Tab. 1. : Die möglichen Fehlpaarungen am Amber-Codon und die daraus resultierenden Phagenphänotypen**

Fehlpaarung	Nukleotidaustausch am Amber-Codon	Phänotyp	Aminosäureaustausch	
			Gen A	Gen B
G:T <sub>Matrize</sub>	T gegen C	<i>wt</i>	Phe-Arg	Gln
C:T <sub>Matrize</sub>	T gegen G	<i>wt</i>	Leu-Arg	Glu
T:T <sub>Matrize</sub>	T gegen A	<i>ts43</i>	Leu-Arg	Lys
G:A <sub>Matrize</sub>	A gegen C	<i>ts42</i>	Phe-Arg	Ser
C:A <sub>Matrize</sub>	A gegen G	<i>ts34</i>	Phe-Gly	Trp
A:A <sub>Matrize</sub>	A gegen T	--	Phe-Trp	Leu
A:G <sub>Matrize</sub>	G gegen T	<i>ts38</i>	Phe-Met	Tyr
G:G <sub>Matrize</sub>	G gegen C	<i>ts35</i>	Phe-Thr	Tyr
A:G <sub>Matrize</sub>	G gegen A	<i>ochre</i>	Phe-Lys	ochre

Die *in vitro* Replikationsgenauigkeit von Polymerasen lässt sich mittels des Amber-Codon Reversionssystem des *E. coli* Bakteriophagen  $\Phi$ X174 $am$ 16 bestimmen (Weymouth & Loeb, 1978; Fersht & Knill-Jones, 1981, 1983). In Abb. 5 ist der Genauigkeitstest schematisch am Beispiel eines einzelsträngigen DNA-Ausgangssubstrats dargestellt.



**Abb. 5 : Das  $\Phi X174am16$ -Reversionssystem**

Die schematische Darstellung des *in vitro*  $\Phi X174am16$ -Genauigkeitssystems verändert nach Grosse, 1985. Für Details siehe Text.

Eine ssDNA oder eine dsDNA mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons wird von der zu untersuchenden Polymerase in eine doppelsträngige DNA, die sog. Replikative Form (RFII, RFIV) überführt. Mit dieser DNA werden Sphäroplasten des Suppressorstammes *E. coli* C600 transfiziert. Die transfizierten Bakterien besitzen eine Amber-Codon Suppressor-tRNA (glnV) und erlauben das Wachstum der Amber-Codon enthaltenden  $\Phi X174am16$ -Phagen und revertierter  $\Phi X174$ -Phagen. Die im Suppressorstamm *E. coli* C600 gebildeten Phagen werden parallel mit dem Suppressorstamm *E. coli* CQ2 (tyrT) und dem Wildtypstamm *E. coli* C analysiert. In Gegenwart von *E. coli* C ergeben die Lysehöfe die Anzahl der revertierten Phagen und repräsentieren damit die während der DNA-Synthese von der Polymerase fehlerhaft eingebauten Nukleotide. Die in Anwesenheit von *E. coli* CQ2 auftretenden Plaques liefern die Gesamtzahl aller Phagen. Das Verhältnis der Phagen auf *E. coli* C (Revertanten) zu *E. coli* CQ2 ergibt die Reversionsfrequenz der Polymerase bei der Replikation des Amber-Codons.

## 1.8 Zielsetzung

Eine frühe Stufe der Tumorentwicklung ist die Ausbildung eines Mutatorphänotyps, der aus Mutationen in Genen, die normalerweise der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität dienen, resultiert (Loeb *et al.*, 1974; Loeb, 1991; Loeb, 2001). Fehler bei der DNA-Synthese oder eine inadäquate Reparatur von DNA-Schäden, welche die Kapazität der Zelle, solche Vorgänge zu korrigieren überschreiten, führen zur Anhäufung von Mutationen. Sowohl an der Replikation als auch der Reparatur sind zwei

DNA-Polymerasen, Pol  $\alpha$ -Prim und Pol  $\beta$ , beteiligt, denen eine intrinsische 3'-5'-Korrektorexonuklease fehlt. Aus diesem Grund synthetisieren beide Polymerasen die DNA nur moderat bis wenig genau. Pol  $\alpha$ -Prim ist essenziell für die Initiation der DNA-Replikation und Pol  $\beta$  von herausragender Bedeutung für die Reparatur von geschädigten Basen. Dies führte zur Entwicklung eines "Proofreading"-Konzepts, in welchem eine autonome 3'-5'-Exonuklease, die von der Polymerase fehlerhaft eingebauten Nukleotide entfernen und so die Genauigkeit erhöhen kann (Perrino & Loeb, 1989). Kürzlich wurden mehrere humane autonome 3'-5'-Exonukleasen identifiziert, die sich durch Interaktionen mit DNA-Polymerasen und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität auszeichnen. So z.B. das Tumorsuppressorprotein P53, dessen Gen in mehr als 50% aller Tumore mutiert vorliegt (Vogelstein & Kinzler, 1992). Das mutierte Werner Protein führt zur erblichen Humanerkrankung Werner Syndrom, verbunden mit genetischer Instabilität und der Bildung von Tumoren (Salk, 1982; Goto *et al.*, 1996). "Knock-out" Mäuse der Apurinischen / Apyrimidinischen Endonuklease 1 sind bereits während der Embryonalentwicklung letal (Ludwig *et al.*, 1998).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die autonomen 3'-5'-Exonukleasen TP53, WRN und APE1 die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim und Pol  $\beta$  erhöhen und somit zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität einer Zelle beitragen können. Außerdem sollte das  $\Phi$ X174 $am16$ -Reversionssystem weiter entwickelt werden, um DNA-Synthese, die einer Basen-Exzisionsreparatur nahe kommt, *in vitro* zu ermöglichen. In diese Aufgabenstellung wurden auch weitere akzessorische Proteine der DNA-Replikation und Reparatur, wie das Einzelstrang-Bindeprotein RPA und die Flap-Endonuklease 1, die als Interaktionspartner der Exonukleasen oder Polymerasen einen Einfluss auf die Genauigkeit haben könnten, mit einbezogen.

Möglicherweise werden die von Pol  $\alpha$ -Prim bei der Primersynthese verursachten Fehler durch einen anderen Mechanismus, das sog. 5'-3'-"Proofreading" entfernt. Aus diesem Grund sollte die Frage nach einer 5'-3'-Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung ebenfalls untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Die Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen und waren von analysenreiner Qualität oder speziell für die Molekularbiologie hergestellt. Für das Ansetzen von Lösungen, Puffern und Medien wurde mit einer Milli-Q-Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) filtriertes Wasser verwendet.

### 2.2 Die Medien

Die in der Bakterienzellkultur verwendeten Kulturmedien:

LB-Medium: 10 g/l NaCl

5 g/l Hefeextrakt (Gibco BRL, Eggenstein)

10 g/l Pepton (Gibco BRL, Eggenstein)

mit 5 M NaOH einen pH-Wert von 7,0 einstellen und autoklavieren.

LB-Agar: wie LB-Medium mit

15 g/l Agar (Gibco BRL, Eggenstein)

Top-Agar: wie LB-Medium mit

7 g/l Agar (Gibco BRL, Eggenstein)

mit 1 M steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung eine Kalziumkonzentration von 10 mM einstellen und mit einer 50-%igen Saccharose-Lösung eine 10-%ige Endkonzentration einstellen.

PA-Medium: 10 g Casamino Acids (DIFCO, Detroit, USA)

10 g Nutrient Broth (DIFCO, Detroit, USA))

in 600 ml H<sub>2</sub>O autoklavieren.

100 g Saccharose

in 300 ml H<sub>2</sub>O autoklavieren.

10 g Glukose

in 100 ml H<sub>2</sub>O autoklavieren.

nach dem Abkühlen auf 60°C alle Komponenten zusammengeben.

### 2.3 Die Bakterienstämme

Die Bakterienstämme *E. coli* C600, *E. coli* C und *E. coli* CQ2 wurden von Prof. Dr. F. Große, Abteilung Biochemie, IMB, Jena, zur Verfügung gestellt.

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> C600	F <sup>-</sup> , thr, leu, thi, lacY, ton A, glnV44 (AS) (supE)	Appleyard, 1954
<i>E. coli</i> C	F <sup>-</sup> , Wildtyp	Sinsheimer, 1959
<i>E. coli</i> CQ2	F <sup>-</sup> , tyrT (supF)	
<i>E. coli</i> HB 101	F <sup>-</sup> , Δ(gtp-proA)62, lsupE44, ara14, galK2, lacY1, Δ(mcrC-mrr), rpsL20, (Str <sup>r</sup> ), xyl-5, mtl-1, recA13, HsdS <sup>(r<sup>-</sup>m<sup>-</sup>)</sup>	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F <sup>-</sup> , dcm, ompT, hsdS <sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, λ (DE3) Prophage mit T7-RNA-Polymerase Gen</sub>	Stratagene

### 2.4 Die Bakteriophagen-DNA

Die DNA des Bakteriophagen ΦX174am16 wurde von Prof. Dr. G. Krauss, Abteilung Biochemie, Universität Bayreuth, bezogen.

Eine mit HIV-RT replizierte ΦX174am16-dsDNA wurde von Dr. S. Nicolaus, Abteilung Biochemie, IMB, Jena zur Verfügung gestellt.

### 2.5 Die Plasmide

Das Plasmid pET-FHC wurde von M.S. Park, Bioscience Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Referenz
pET-FCH (pET 28b (Novagen) und humanes FEN1)	Nolan <i>et al.</i> , 1996

## 2.6 Die Proteine

Die in den Studien zur Fehlerkorrektur verwendeten Proteine wurden von Dipl.-Biochem. P. Freede, Dr. H. Hartmann, PD Dr. H.-P. Nasheuer, Dr. S. Nicolaus, Dr. K. S e und Dr. S. Zhang, Abteilung Biochemie, IMB, Jena und von Dr. J. Christensen, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Panum Institut, Universität Kopenhagen, Dänemark in aufgereinigter und aktiver Form zur Verfügung gestellt (Tab. 2).

**Tab. 2 : Die gereinigten Proteine**

Eine Übersicht der freundlicherweise von Kollegen zur Verfügung gestellten gereinigten Proteine mit Angaben zu Untereinheiten, Herkunft und Expressionssystemen.

Protein	Untereinheiten	Herkunft	Aufarbeitung aus	Präparation
TP53	p53	murin	His-tag, Insektenzellen	Dr. H. Hartmann
TP53	p53	bovin	His-tag, Insektenzellen	Dr. H. Hartmann
TP53	p53	bovin	GST, <i>E. coli</i>	Dr. H. Hartmann
TP53	p53	human	Insektenzellen	Dr. H. Hartmann
TP53	p53	murin	His-tag, Insektenzellen	Dr. K. S�e
RPA	p70, p34, p14	human	<i>E. coli</i>	P. Freede
Pol $\alpha$ -Prim	p180, p68, p58, p48	human	Insektenzellen	Dr. H. Hartmann
Pol $\alpha$ -Prim	p180, p68, p58, p48	bovin	Kalbsthymus	Dr. H. Hartmann
Pol $\beta$	p39	human	<i>E. coli</i>	PD Dr. H.-P. Nasheuer
Pol $\delta$	p125, p66, p50, p12	human	Insektenzellen	Dr. J. Christensen
RFC	p140, p40, p38, p37, p36	human	Insektenzellen	Dr. J. Christensen
PCNA	p34	human	Insektenzellen	Dr. J. Christensen
RPA	p70, p34, p14	human	Insektenzellen	Dr. J. Christensen
WRN	p160	human	Insektenzellen	Dr. S. Zhang

## 2.7 Die Enzyme

Die käuflich erworbenen Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Peqlab (Erlangen) und Novus Biologicals (Littleton, UK) bezogen.

Firma	Enzym
Amersham Biosciences	AMV-Reverse Transkriptase, Sequenase Version 2.0 (T7-Pol)
New England Biolabs	T7-Pol, Klenow Pol, Klenow Pol exo <sup>-</sup> , T4-Ligase, T4-PNK, Exonuklease III, Restriktionsendonukleasen NcoI und BamHI
Novus Biologicals	APE1
Peqlab	T4-Pol
Roche Molecular Biochemicals	Terminale Transferase

## 2.8 Die Replikationsprimer

Die Oligonukleotide Primer 1 und der Korrekturprimer 1 wurden vom Industriepartner NAPS (Göttingen) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Primer 2, 3, 4 und Korrekturprimer 2 wurden von Frau A. Willitzer, Abteilung Biochemie, IMB, Jena, synthetisiert. Die Oligonukleotide 5, 6 und 7 wurden von Purimex, Nucleic Acids Technology (Göttingen) synthetisiert.

Die Replikationsprimer 1, 2 und 3 hybridisieren stromaufwärts und Primer 4 stromabwärts des Amber-Codons auf der  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA mit korrekter Basenpaarung (Tab. 3).

**Tab. 3 : Die Replikationsprimer mit korrekter Basenpaarung**

Die Oligonukleotide 1 und 3 hybridisieren stromaufwärts direkt vor dem Amber-Codon, Primer 2 10 Nt vor dem Amber-Codon. Diese Primer wurden im  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem zur Bestimmung der Replikationsgenauigkeit von Polymerasen eingesetzt. Primer 4 hybridisiert stromabwärts vom Amber-Codon und wurde zur Konstruktion des doppelsträngigen  $\Phi$ X174 $am$ 16-Substrats eingesetzt.

Name	Position im Gen AB	Sequenz
Primer 1	AB 5279-5293	5'- GTA ACT TTT CCC AGC -3'
Primer 2	AB 5289-5304	5'- CGT CGG CTA CAG TAA C -3'
Primer 3	AB 5279-5313	5'- CC GCC AAA ACG TCG GCT ACA GTA ACT TTT CCC AGC -3'
Primer 4	AB 5231-5272	5'- CTC ATC TCT CTT TTT GCG TTC TGC TTC AAT ATC TGG T -3'

Die Primer 5, 6 und 7, sowie die Korrekturprimer hybridisieren direkt auf dem Amber-Codon und induzieren eine G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung an Position 5276 im Gen AB (Tab. 4).

**Tab. 4 : Die Replikationsprimer mit einer fehlgepaarten Base**

Diese Primer provozieren, auf einzelsträngige  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA hybridisiert, eine G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung an Position Gen AB 5276 im Amber-Codon des Bakteriophagen. Die Korrekturprimer 1 und 2 wurden zur Bestimmung der Fehlerausbeute und die Primer 5-7 im Assay zur Okazaki-Fragment-Prozessierung eingesetzt. Primer 8 mit endständiger Fehlpaarung wurde zur Bestimmung eines 3'-5'-Korrekturlesens verwendet.

Name	Position im Gen AB	Sequenz
Korrekturprimer 1	AB 5270-5289	5'- CT TTT CCC AGC CT <b>G</b> AAT CTC -3'
Korrekturprimer 2	AB 5273-5293	5'- GTA ACT TTT CCC AGC CT <b>G</b> AAT -3'
Primer 5	AB 5263-5284	5'- CCC AGC CT <b>G</b> AAT CTC ATC TCT C -3'
Primer 6	AB 5263-5281	5'- AGC CT <b>G</b> AAT CTC ATC TCT C -3'
Primer 7	AB 5256-5278	5'- CT <b>G</b> AAT CTC ATC TCT CTT TTT GC -3'
Primer 8	AB 5276-5293	5'- GTA ACT TTT CCC AGC CT <b>G</b> -3'



## 2.9 Die Oligonukleotide für die Exo- und Endonukleasetests

Die gereinigten Oligonukleotide (Tab. 5; Tab. 6) für die Nukleasetests wurden von Dr. H. Hartmann und Dr. K. Søre zur Verfügung gestellt.

**Tab. 5 : Die Oligonukleotide für Exonukleasetests**

Auf folgenden, aus einem oder mehreren Oligomeren zusammengesetzten DNA-Substraten, wurde die Exonukleaseaktivität der verwendeten 3'-5'-Exonukleasen und der 5'-3'-Exonuklease nachgewiesen.

Name	Bemerkung	Sequenz
30mer	für TP53	5' -GAC ACT GGT CAC ACT TGG CTG CTT AGG AAT -3'
22 / 74mer	Primer / Matrize mit 3'-rezessivem Ende für WRN und Pol $\delta$	5'- CAG GTA AGC TTG GCG GGG ATC C -3'  5'- CCG GGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT AAG TCT TTT TTT GCC TTC GCC CGG ATC CCC GCC AAG CTT ACC TG -3'
22 / 25 / 74mer	Primer / Primer / Matrize, doppelsträngiges Substrat mit "nick" für FEN1	5'- CAG GTA AGC TTG GCG GGG ATC C -3'  5'- GGG CGA AGG CAA AAA AAG ACT TAG A -3'  5'- CCG GGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT AAG TCT TTT TTT GCC TTC GCC CGG ATC CCC GCC AAG CTT ACC TG -3'
15mer / $\Phi$ X174 $am$ 16-dsDNA mit einer Lücke von 21 Nt	doppelsträngiges Substrat mit einer sechs Nukleotide umfassenden Lücke für APE1	5'- GTA ACT TTT CCC AGC -3'
16mer / $\Phi$ X174 $am$ 16-dsDNA mit einer Lücke von 21 Nt	doppelsträngiges Substrat mit einer fünf Nukleotide umfassenden Lücke und einer G:G-Fehlpaarung am 3'-Ende für APE1	5'- GTA ACT TTT CCC AGC G -3'

**Tab. 6 : Die Oligonukleotide für den Endonukleasetest von FEN1**

In der nachfolgenden Tabelle sind die Sequenzen der Oligomere, aus denen das DNA-Substrat für den Endonukleasetest von FEN1 zusammengesetzt ist, aufgelistet

Name	Bemerkung	Sequenz
25 / 30 / 74mer	Primer / Primer / Matrize mit einem 5'-"flap" von drei Nukleotiden für FEN1	5'- GGG CGA AGG CAAAAA AAG ACT TAG A -3'  5'- AGAAAA AAA AAA AAA AAA AAG GAT CCC CGG -3'  5'- CCG GGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT AAG TCT TTT TTT GCC TTC GCC CGG ATC CCC GCC AAG CTT ACC TG -3'

### 3. Methoden

#### 3.1 Die Expression rekombinanter Proteine

Die Präparation kompetenter *E. coli* BL21 DE3-Zellen und ihre Transformation erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1. und 3.4.2. für HB 101 Zellen beschrieben.

##### 3.1.1 Die Proteinexpression in *Escherichia coli* BL21 DE3

Die kompetenten BL21 DE3-Zellen wurden sofort nach dem Auftauen transformiert und auf LB-Agarplatten (Ka<sup>30</sup>) angezogen. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium (Ka<sup>30</sup>) überführt und 12 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium (Ka<sup>30</sup>) angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde mit 1 mM IPTG induziert und das Protein für 3-3½ h exprimiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 x g (Beckman, Rotor JA-14) sedimentiert, mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

PBS-Puffer: 150 mM NaCl

13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 mM KCl

mit HCl pH 7,4 einstellen und autoklavieren.

##### 3.1.2 Die Reinigung von rekombinantem His-tag FEN1

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Das Zellsediment wurde mit dem Ultraschallpuffer (1/20 Volumen der Schüttelkultur) versetzt und aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall mit dem Ultraschall-Gerät (Branson-Sonifier) auf Stufe 3 für 10 x 30 s. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei 30000 x g (Beckmann, Rotor A-25.50) sedimentiert; das FEN1 befand sich in löslicher Form im Überstand. Dieser Rohextrakt wurde über 1 ml Talonsäule (CLONTECH, Palo Alto, USA), die sich in einer Econo-Säule befand, gegeben und dann mit 25 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen zu je 500 µl mit Elutionspuffer. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die FEN1-haltigen Fraktionen über Nacht gegen den Dialysepuffer dialysiert und anschließend bei -20°C gelagert.

---

Ultraschallpuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,9 100 mM Sorbitol 20 mM Imidazol direkt vor Gebrauch 1 mM PMSF und 1 % Aprotinin zugesetzt.
Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9 500 mM NaCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9 500 mM NaCl 350 mM Imidazol
Dialysepuffer:	30 mM HEPES, pH 7,6 30 mM KCl 20 % Glycerin 0,5 mM EDTA 0,01 % NP-40 1 mM DTT

## 3.2 Die Analyse von Proteinen

### 3.2.1 Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Konzentration einer Proteinlösung kann mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue bestimmt werden. Die Bildung eines unspezifischen Farbstoff-Protein-Komplexes ruft eine Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs hervor. Dabei ist die Proteinkonzentration in einem begrenzten Bereich proportional zur Absorptionserhöhung bei 595 nm.

Das Bradfordreagenz (Biorad, München) wurde vor Gebrauch 1:5 verdünnt. Davon wurden 1 ml mit 10 µl Proteinlösung bzw. Puffer vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Bestimmung der Absorption der Probe erfolgte bei 595 nm. Mittels einer Eichkurve (0-500 µg/ml bovines Serumalbumin) konnte die Konzentration der Probe berechnet werden.

### 3.2.2 Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und die Abschätzung der Reinheit einer Präparation war mit Hilfe der SDS-PAGE möglich. Es wurden 10-%ige Gele in einer Elektrophorese Apparatur (Biometra-Minigel) für ca. 1½ h bei 25 mA eingesetzt. Dabei kam das von Laemmli (1970) entwickelte Puffersystem zur Anwendung. Durch

Zugabe von 0,01 Volumen 10-%igem APS und 0,001 Volumen TEMED wurde die Polymerisationsreaktion gestartet und das Trenngel zunächst mit Ethanol überschichtet. Die Proteinproben wurden mit 1/6 Volumen 6x Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Trenngel:	10 % (w/v) Acryl- / Bisacrylamid 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel:	4,95 % (w/v) Acryl- / Bisacrylamid 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 193 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
6x Proteinprobenpuffer:	300 mM Tris/HCl, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 550 mM DTT 2 % (v/v) SDS 0,005 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.2.3 Die Coomassie Brilliant Blue Proteinfärbung

Die Proteingele wurden nach der SDS-PAGE für ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt. In einer Entfärberlösung wurde das Gel entfärbt bis die Proteinbanden deutlich hervortraten. Zur Dokumentation wurden die Gele in einer Trockenlösung äquilibriert und zwischen zwei Zellophanfolien (Novex, San Diego) getrocknet.

Färbelösung:	46,8 % (v/v) Methanol 6,3 % (v/v) Essigsäure 0,027 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung:	5 % (v/v) Methanol 3,3 % (v/v) Essigsäure
Trockenlösung:	40 % (v/v) Methanol 2 % (v/v) Glycerin

### 3.3 Die Charakterisierung der Proteine

Zur Charakterisierung der in den Studien zur Fehlerkorrektur verwendeten, Nukleasen wurden Exo- und Endonukleasetests mit verschiedenen radioaktiv markierten DNA-Substraten (vgl. 2.9.) durchgeführt.

#### 3.3.1 Die 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP

Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) phosphoryliert unter ATP-Hydrolyse 5'-OH-Gruppen von DNA-Molekülen.

5'-Phosphorylierung:      20 pmol Oligonukleotid  
   10x T4-PNK Puffer  
   7,4 x 10<sup>5</sup> Bq  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP (1,1 x 10<sup>14</sup> Bq/mmol, Amersham Pharmacia  
   Biotech, Freiburg)  
   10 U T4-PNK  
   mit H<sub>2</sub>O auf 30  $\mu$ l auffüllen.

Die Reaktion wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und durch eine Erwärmung auf 85°C für 10 min gestoppt.

Zur Herstellung eines partiell doppelsträngigen Substrats aus Primer / Matrize wurde das markierte Oligonukleotid mit einem 2-fachen molaren Überschuss der Matrize versetzt. Die Denaturierung erfolgte bei 85°C für 10 min; ein langsames Abkühlen auf Raumtemperatur ermöglichte die Hybridisierung der DNA. Anschließend wurde mit STE-Puffer auf 100  $\mu$ l aufgefüllt. Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde durch Gel-filtration an einer NAP<sup>TM</sup>-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt. Die Säule wurde in zwei Schritten mit je 2 ml STE-Puffer äquilibriert (2 min, 750 x g, 4°C). Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert (2 min, 750 x g, 4°C). Das 5'-markierte Oligonukleotid befand sich im Durchlauf. Abschließend wurde 1  $\mu$ l des Substrates im Packard Tri-Carb 1900TR Szintillationszähler (Packard, Dreieich) untersucht.

T4-PNK Puffer (10x): 700 mM Tris/HCl, pH 7,6  
   100 mM MgCl<sub>2</sub>  
   50 mM DTT  
   Lagerung bei -20°C.

STE-Puffer:                    100 mM NaCl  
   10 mM Tris/HCl, pH 8  
   1 mM EDTA, pH 8

### 3.3.2 Die 3'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ddATP

Die Terminale Transferase ist eine Polymerase, die in Anwesenheit von divalenten Kationen die Addition von Didesoxynukleotiden an ein 3'-OH-Ende von DNA-Molekülen katalysiert.

3'-Phosphorylierung:     20 pmol Oligonukleotid  
                                10x Terminale Transferase Puffer  
                                2,5 mM CoCl<sub>2</sub>  
                                1,85 x 10<sup>6</sup> Bq  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ddATP (1,1 x 10<sup>14</sup> Bq/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
                                25 U Terminale Transferase  
                                mit H<sub>2</sub>O auf 50  $\mu$ l auffüllen.

Die Reaktion wurde bei 37°C für 1 h inkubiert und die Terminale Transferase danach bei 75°C für 10 min inaktiviert.

Zur Herstellung eines Substrats aus Primer und Matrize wurde wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben vorgegangen.

Terminale Transferase 200 mM Tris/Ac, pH 7,9  
Puffer (10x):             500 mM KAc  
                                100 mM MgAc  
                                10 mM DTT

### 3.3.3 Die Detektion von 3'-5'-Exonukleaseaktivität

Zum Nachweis von 3'-5'-Exonukleaseaktivität wurden 5'-radioaktiv markierte Oligonukleotidsubstrate eingesetzt. Dabei handelte es sich um einzelsträngige DNA oder um Substrate aus einem 5'-markierten Primer, der auf eine längere Matrize hybridisiert ist.

Exonukleasetest: 300 Bq DNA-Substrat  
                          10x Reaktionspuffer  
                          0,1 mg/ml BSA  
                          mit H<sub>2</sub>O auf 10  $\mu$ l auffüllen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der zu testenden Exonuklease (TP53, WRN, APE1) gestartet und bei 37°C für die angegebene Zeit inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10  $\mu$ l Probenpuffer gestoppt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Reaktionsprodukte (10  $\mu$ l Probe) wurden mittels Harnstoff-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt.

Exonukleasepuffer TP53, APE1 (10x): 200 mM Tris/Ac, pH 7,3  
750 mM KAc, pH 7,3  
50 mM MgAc, pH 7,3  
10 mM DTT  
Lagerung bei -20°C.

Exonukleasepuffer WRN (10x): 400 mM Tris/HCl, pH 8  
40 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM ATP  
50 mM DTT  
1 mg/ml BSA  
Lagerung bei -20°C.

Probenpuffer (2x): 90 % (v/v) Formamid  
10 mM EDTA  
0,25 % (w/v) Xylen Xyanol FF  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.3.4 Die Detektion von 5'-3'-Exonukleaseaktivität

Zum Nachweis von 5'-3'-Exonukleaseaktivität wurde ein 3'-markiertes Oligonukleotidsubstrat eingesetzt. Dabei handelte es sich um ein Substrat aus einem 3'-markiertem Primer und einem unmarkierten Primer auf einer längeren Matrize.

Die Reaktion wurde wie unter Abschnitt 3.3.3. beschrieben durchgeführt und mit der zu testenden Exonuklease (FEN1) gestartet.

Exonukleasepuffer FEN1 (10x): 400 mM Tris/HCl, pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT  
Lagerung bei -20°C.

### 3.3.5 Die Detektion von 5'-3'-Endonukleaseaktivität

Zum Nachweis von 5'-3'-Endonukleaseaktivität wurde ein Substrat aus zwei Primern, einer davon war 5'-radioaktiv markiert, und einer längeren Matrize hergestellt. Die Primer besaßen eine partiell überlappende Sequenz von drei Nukleotiden, so dass die Bildung von 5'-markierten und 3'-unmarkierten "flap"-Strukturen möglich war. Die Reaktion wurde wie unter Abschnitt 3.3.4. beschrieben durchgeführt und mit der zu testenden Endonuklease (FEN1) gestartet.

### 3.3.6 Die Harnstoff-Polyacrylamidelektrophorese

Die Auftrennung von Oligonukleotiden erfolgte mit Harnstoff-Polyacrylamidgelen der Abmessung 35 x 30 x 0,4 mm in einer Sequenzgel-Apparatur SA-32 (Gibco BRL, Eggenstein). Es kamen 14-%ige Polyacrylamidgele (Sequagel, National Diagnostics, Hull) zum Einsatz. Die Polymerisation wurde mit 1/400 Volumen 10 % APS und 1/2500 Volumen TEMED gestartet. Die Gele wurden bei 65 Watt bis 50°C erwärmt, der Harnstoff aus den Taschen gespült und die denaturierten Proben aufgetragen. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für 2 h bei 65 Watt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3 mm Papier (Maidstone, UK) aufgezogen, mit Frischhaltefolie bedeckt und unter Vakuum bei 80°C für 1½ h getrocknet. Das Gel wurde dann 12 h mit einem Phosphoimager-Screen exponiert. Der Screen wurde anschließend in einem Phosphoimager Storm 860 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingelesen. Die Quantifizierung der autoradiographisch detektierten Banden erfolgte mit der ImageQuant Software (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

14 % Harnstoff-Polyacrylamidgel: 7,5 ml Sequagel Laufpuffer  
25,5 ml Sequagel Verdünnungspuffer  
42 ml Sequagel Konzentrat

## 3.4 Die Aufreinigung und Analyse von DNA

### 3.4.1 Die Präparation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterienzellen (Mandel & Higa, 1970)

Mit einer Kolonie *E. coli* HB 101 von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte wurde eine 10 ml Vorkultur angeimpft. Es wurden 500 ml LB-Medium mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub>=0,5 erreicht war. Die Zellen wurden dann 30 min in einem Eisbad gekühlt und bei 2000 x g, 4°C für 10 min (Beckman Rotor JA-14) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 125 ml vorgekühltem, sterilem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> auf Eis resuspendiert und bei 2000 x g, bei 4°C für 10 min zentrifugiert (Beckman, Rotor 10.500). Die Zellen wurden in 25 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> auf Eis resuspendiert und es wurden 225 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Die Zellen wurden in 4,25 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> auf Eis resuspendiert und mit 750 µl gekühltem Glycerin versetzt und vermischt. Die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen wurden in 100 µl Fraktionen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.



### 3.4.2 Die Transformation von Bakterien

Die Transformation erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Zu 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* HB 101 Zellen wurden 50 ng Plasmid-DNA pET-FCH (pET 28b mit hFEN1) gegeben, vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend verdünnt und auf LB-Platten (Ka<sup>30</sup>) ausplattiert und bei 37°C 12 h inkubiert.

### 3.4.3 Die Plasmidaufreinigung mit Qiagen-Säule 100

Mit einer transformierten Kolonie *E. coli* HB 101 wurde eine 5 ml LB-Medium (Ka<sup>30</sup>) Vorkultur angeimpft und für 8 h bei 37°C geschüttelt (200 rpm). 25 ml LB-Medium (Ka<sup>30</sup>) wurden mit 1/500 Volumen Vorkultur angeimpft und bei 37°C 12 h bei 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden bei 6000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert und das Zellsediment wurde in 4 ml Puffer 1 resuspendiert. Danach wurden 4 ml Puffer 2 hinzugefügt, durch Schwenken vermischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Dann wurden 4 ml vorgekühlter Puffer 3 hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 20000 x g , 4°C für 30 min zentrifugiert (Beckman, Rotor 10.500). Der plasmidhaltige Überstand wurde nochmals diesem Zentrifugationsschritt unterworfen und dann auf eine Qiagen-Säule 100 (Qiagen, Hilden) gegeben, die zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert wurde. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde dann durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert und bei 15000 x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Sediment mit 2 ml 70-%igem Ethanol gewaschen und bei 15000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Der DNA-Niederschlag wurde für 5 min an der Luft getrocknet anschließend in 20 µl TE-Puffer pH 8 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Puffer 1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer 2 (Lysispuffer):	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer 3 (Neutralisationspuffer):	3 M Kaliumacetat, pH 5

Puffer QBT (Äquilibriumspuffer):	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton® X-100
Puffer QC (Waschpuffer):	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % (v/v) Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % (v/v) Isopropanol
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA

#### 3.4.4 Die DNA-Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA wurde die DNA einem Restriktionsverdau mit nachfolgender elektrophoretischer Produktaufreinigung unterzogen.

Restriktionsverdau:	1 µg DNA (pET-FCH) 10 U <i>Nco</i> I Restriktionsendonuklease 10 U <i>Bam</i> HI Restriktionsendonuklease 10x <i>Bam</i> HI Puffer 0,1 mg/ml BSA mit H <sub>2</sub> O auf 20 µl auffüllen.
---------------------	---

Die Reaktion wurde bei 37°C für 2 h inkubiert und durch eine Erwärmung auf 65°C für 5 min abgestoppt.

<i>Bam</i> HI Puffer (10x):	1,5 M NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 7,9 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT Lagerung bei -20°C.
-----------------------------	---

#### 3.4.5 Die DNA-Elektrophorese im Agarosegel

Die Bestimmung von Reinheit und Größe der DNA erfolgte mittels einer Gelelektrophorese im Agarosegel. Dieses Verfahren erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten von ca. 200 Bp bis ca. 20000 Bp. Verwendet wurde eine Flachbettgelkammer (Agagel Mini, Biometra) mit 1-%igen AE-Agarosegelen und 1x AE-Elektrophoresepuffer.

Die DNA-Proben wurden mit 1/2 Volumen Probenpuffer versetzt in die Geltaschen eingefüllt. Die Gele liefen bei einer Spannung von 60 V (5 V/cm). Nach beendetem Lauf wurde die DNA in einer EthBr-Lösung (0,2 µg/ml) angefärbt und auf einem 254 nm-UV-Tisch (INTAS, Mitsubishi) analysiert. Die Dokumentation erfolgte fotografisch oder digital mit einer INTAS-Videosystem-Anlage (Mitsubishi).

Die verschiedenen replikativen Formen der DNA, insbesondere geschlossen zirkuläre und offen zirkuläre, wurden unter Zugabe von EthBr (0,2 µg/ml) in Gel und Laufpuffer analysiert. Als Standards für die Replikation der DNA des Phagen  $\Phi$ X174*am*16 dienten einzelsträngige und offen bzw. geschlossen zirkuläre Formen der DNA.

20x AE-Elektrophoresepuffer:	800 mM Tris
	100 mM Natriumacetat
	20 mM EDTA
	mit Essigsäure pH-Wert 7,9 einstellen.
Probenpuffer:	20 % (w/v) Ficoll
	0,025 % (w/v) Bromphenolblau
	in AE-Puffer lösen.

### 3.4.6 Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit mittels UV-Messung

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA und zur Detektion von Proteinverunreinigungen wurde die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Proteine absorbieren auch bei 260 nm und machen eine Überprüfung auf Proteinkontamination nötig. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Wert aus dem Quotienten  $A_{260} / A_{280}$ , der größer als 1,7 ist

Der DNA-Gehalt errechnet sich wie folgt:

$A_{260} \times (50 \text{ µg/ml})$  entspricht der Konzentration an dsDNA

$A_{260} \times (33 \text{ µg/ml})$  entspricht der Konzentration an ssDNA

## 3.5 Die Aufreinigung von einzelsträngiger $\Phi$ X174*am*16-DNA

### 3.5.1 Die Präparation einer Phagenstammlösung

Ein Lysehof des Phagen  $\Phi$ X174*am*16 wurde aus einer Petrischale ausgestochen, in 1 ml Boratpuffer überführt und 12 h bei 4°C geschüttelt. Mit dieser Phagensuspension wurde unter Schütteln eine 100 ml Kultur (LB-Medium, pH 7,5; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) des Stammes *E. coli* CQ2 bei einer  $\text{OD}_{600}=0,7-0,8$  infiziert. Nach 2-3 h Inkubation bei 37°C setzte die Zelllyse ein und die  $\text{OD}_{600}$  sank auf einen Wert von 0,3-0,4. Die infizierten

Zellen und phagenhaltigen Zelltrümmer wurden bei 10000 x g und 4°C für 15 min (Rotor 19776, Sigma Zentrifuge 3K30) sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 ml Boratpuffer aufgenommen und 12 h bei 4°C geschüttelt. Die noch intakten Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (5 x 30 s, Stufe 2, Branson Sonifier) und bei 25000 x g und 4°C für 15 min (Rotor A8.20, Zentrifuge Centrikon T324, Kontron Instruments) zentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Der Phagentiter der Phagenstammlösung sollte mindestens  $3 \times 10^{10}$  pfu/ml betragen.

Boratpuffer: 50 mM Borsäure/NaOH, pH 8,3, sterilfiltrieren.

### 3.5.2 Die Bestimmung des Phagentiters

Von der Phagenstammlösung ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich  $10^5$ - $10^{12}$  in Boratpuffer angefertigt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit 250 µl Indikatorbakterien *E. coli* CQ2 und 2,5 ml flüssigem Top-Agar vermischt und auf einer LB-Platte ausgegossen. Die Platten wurden für 3-4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis auf dem Bakterienrasen die Lysehöfe der Phagen sichtbar wurden. Die Titerbestimmung erfolgte durch Auszählen der Lysehöfe.

Als Nachweis für das Vorhandensein des Amber-Codons wurde eine Kontrolle mit dem Indikatorbakterium *E. coli* C ohne Suppressoreigenschaften durchgeführt. Dazu wurde wie oben vorgegangen, allerdings mit unverdünnter Phagensuspension. Es sollten nur wenige Lysehöfe (Spontanrevertanten) entstehen.

### 3.5.3 Die Anzucht der Phagen

Das LB-Medium (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5; 6 x 500 ml) wurde mit je 8 ml CQ2-12 h-Kultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler (200 rpm) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7-0,8 inkubiert. Unter Schütteln wurden die Zellen durch langsames Zutropfen der Phagenlösung infiziert. Dabei sollte die Virusmenge mindestens ein Virus pro Bakterienzelle betragen. Die Zugabe von steriler Magnesiumsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 250 mM 8 min nach der Infektion verhinderte die Zelllyse durch die Phagen. Nach weiteren 3 h Inkubationszeit, wurden die Zellen bei 10000 x g und 4°C (Rotor AS4.7, Zentrifuge Centrikon T324, Kontron Instruments) geerntet. Die Zellen wurden in 20 ml Boratpuffer aufgenommen und 12 h bei 4°C geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (5 x 30 s, Stufe 2, Branson Sonifier) aufgeschlossen und bei 25000 x g und 4°C für

15 min sedimentiert (Rotor A8.20, Zentrifuge Centrikon T324, Kontron Instruments). Der opaleszierende phagenhaltige Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert.

Magnesiumsulfatlösung: 2,5 M MgSO<sub>4</sub>, autoklavieren.

### 3.5.4 Die Isolierung der Phagen im Cäsiumchloridgradienten

Die Phagensuspension wurde auf einen CsCl-Gehalt von 37,4 % (w/w) eingestellt. Der Brechungsindex  $n_D^{20}$  sollte nach der Einwaage 1,3701 betragen (mit dem Refraktometer überprüfen), was einer Dichte von 1,382 g/ml entspricht. Die phagenhaltige Cäsiumchloridlösung wurde für 13 h bei 20°C und 50000 rpm (Vertikal Rotor VTi 50, Beckmann Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Die Phagen bilden eine Bande im sich ausbildenden linearen Gradienten. Knapp unterhalb der sichtbaren Phagenbande wurde das Zentrifugationsgefäß mit einer Kanüle seitlich eingestochen. Die Phagen wurden abgezogen und in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Der Phagentiter der Fraktionen wurde bestimmt. Die phagenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und einer erneuten Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten unterzogen. Die phagenhaltigen Fraktionen wurden zweimal gegen 2 l Boratpuffer dialysiert.

### 3.5.5 Die Extraktion der DNA aus den Phagen

Zur Isolation der einzelsträngigen DNA aus den Phagen wurde die wässrige Phagensuspension bei Raumtemperatur in mehreren Stufen abwechselnd extrahiert und bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert: zweimal 1 Volumen Phenol / TE pH 8, zweimal 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1 v/v), zweimal 1 Volumen Diethylether / TE pH 8. Die wässrige DNA-haltige Lösung wurde mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 5,5 12 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA zweimal mit 70-%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Dann wurde die DNA in 1 ml TE-Puffer pH 8 aufgenommen, portioniert und bei -80°C gelagert. Die einzelsträngige DNA wurde auf einem 1-%igen Agarosegel und im UV-Spektrum analysiert.

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

### 3.6 Die Konstruktion eines doppelsträngigen $\Phi$ X174 $am$ 16-Substrates

Es soll ein doppelsträngiges  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA-Substrat mit einem einzelsträngigen Bereich am Amber-Codon hergestellt werden.

Zwei Primer, die das Amber-Codon flankieren, wurden auf die einzelsträngige DNA hybridisiert und mit T7-Polymerase zur replikativen Form aufgefüllt (vgl. 3.6.1 und 3.7) und auf einem Agarosegel analysiert. Der stromaufwärts vom Amber-Codon befindliche 15mer Primer wurde um sechs Nukleotide zu einem 21mer verlängert. Dieser neue Primer wurde durch eine Erwärmung der DNA auf 55°C herausgeschmolzen und mittels der NucleoSpin Extract 2 in 1 Säulchen (Macherey-Nagel, Düren) ebenso abgetrennt wie die im Überschuss vorhandenen Ausgangsprimer. An das Säulenmaterial binden DNA-Fragmente von 100-10000 Basenpaaren, d.h. kleinere Fragmente werden aus der DNA-Lösung entfernt. Dazu wurden 200  $\mu$ l Replikationsansatz für 5 min auf 55°C erhitzt und mit 400  $\mu$ l vorgewärmten NT2-Puffer vermischt, auf die Säulchen geladen und für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 600  $\mu$ l NT3-Puffer gewaschen. Dieser Schritt wurde mit 200  $\mu$ l NT3-Puffer wiederholt. Zur Entfernung des im Waschpuffer enthaltenen Ethanol wurden die Säulchen nochmals für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die doppelsträngige DNA mit einem einzelsträngigen Bereich in der Region des Amber-Codons wurde mit auf 50°C vorgewärmten 50  $\mu$ l NE-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert. Im Transformationsexperiment wurde das Vorhandensein des einzelsträngigen Bereichs am Amber-Codon überprüft.

NT2-Puffer: keine Angabe des Herstellers

NT3-Puffer: keine Angabe des Herstellers

NE-Puffer: 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

#### 3.6.1 Die *in vitro* Replikation mit T7-Polymerase

Für einen 200  $\mu$ l Ansatz:

Hybridisierung: 24 pmol Primer 1

24 pmol 5'-phosphorylierter Primer 14

2,4 pmol  $\Phi$ X174 $am$ 16-ssDNA

mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 auf 60  $\mu$ l Volumen auffüllen und

5 min auf 68 °C erwärmen und langsam abkühlen.

Replikation: 10x Reaktionspuffer T7-Polymerase  
10x Nukleotidmix  
0,05 mg/ml BSA  
10 U T7-Polymerase  
mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl auffüllen.  
Inkubation für 1 h bei 37°C.

Reaktionspuffer 200 mM Tris/HCl, pH 7,5  
T7-Polymerase (10x): 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT  
Lagerung bei -20°C.

### 3.7 Die *in vitro* Replikation der $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA

Zur Bestimmung der Replikationsgenauigkeiten von Polymerasen *in vitro* und der 5'-Fehlerkorrektur wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt und wie beschrieben inkubiert:

Hybridisierung: 4,8 pmol 5'-phosphorylierter Primer  
0,48 pmol  $\Phi$ X174 $am$ 16-ssDNA bzw. dsDNA mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons  
mit 50 mM Tris/Ac bzw. Tris/HCl (entsprechend dem Reaktionspuffer) auf 12 µl Volumen auffüllen.

Die DNA wurde mit einem 10-fachen Überschuss des Primers zunächst denaturiert (55-65°C) und anschließend langsam auf 25°C abgekühlt.

Replikation: Hybridisierungsansatz  
10x Reaktionspuffer  
10x Nukleotidmix  
0,1 mg/ml BSA  
160 U T4 Ligase  
mit H<sub>2</sub>O auf 40 µl auffüllen.

Mit Zugabe einer Polymerase wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei 37°C bis die DNA vollständig in die doppelsträngigen Replikativen Formen (offen und geschlossen zirkulär) überführt war. 5 µl des Ansatzes wurden auf einem 1-%igen Agarosegel analysiert.

Nukleotidmix (10x): 10 mM ATP, pH 7  
je 1 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP  
Lagerung bei -70°C.

### 3.7.1 Die *in vitro* Replikation mit Polymerase $\alpha$ -Primase

Die Replikationsreaktion wurde mit 180 ng (0,2 U) humaner rekombinanter Pol  $\alpha$ -Prim bzw. 180 ng (0,43 U) Pol  $\alpha$ -Prim aus Kalbsthymus durchgeführt; dies entspricht einem Mol Polymerase pro Mol DNA. Für eine Primase initiierte Replikation wurde auf den Einsatz eines Primers verzichtet und die entsprechenden Ribonukleotide hinzugefügt.

Reaktionspuffer Pol  $\alpha$ -Prim (10x): 200 mM Tris/Ac, pH 7,3  
750 mM KAc, pH 7,3  
50 mM MgAc, pH 7,3  
10 mM DTT  
Lagerung bei -20°C.

Ribonukleotidmix (10x): je 1 mM UTP, GTP, CTP  
Lagerung bei -70°C.

### 3.7.2 Die *in vitro* Replikation mit Polymerase $\beta$

Zur Replikation wurden 20 ng (1,2 U) Pol  $\beta$  eingesetzt; dies entspricht einem Mol Polymerase pro Mol  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA.

Reaktionspuffer wie bei Pol  $\alpha$ -Prim.

### 3.7.3 Die *in vitro* Replikation mit Polymerase $\delta$ -Holoenzym

Die DNA wurde mit dem Einzelstrang-Bindeprotein RPA (1800 ng), dem sog. "clamp loader" RFC (30 ng) und PCNA (120 ng) bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Die Replikation wurde mit Pol  $\delta$  (60 ng) gestartet; dies entspricht einem halben Mol Polymerase pro Mol  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA.

Reaktionspuffer Pol  $\delta$  (10x): 400 mM Tris/HCl, pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT  
Lagerung bei -20°C.





### 3.7.9 Die Replikation unter “nucleotide pool bias“ Bedingungen

Den Anteil der Fehler, den die verschiedenen möglichen Fehlpaarungen am Amber-Codon an der Über-Alles-Genauigkeit haben, wurden mittels einer Replikation unter sogenannten “nucleotide pool bias“ Bedingungen bestimmt.

Die Nukleotide wurden dazu in nicht-äquimolaren Verhältnissen eingesetzt, d.h. die inkorrekten und korrekten Nukleotide wurden in einem Verhältnis von 10:1 und 30:1 eingesetzt und somit die Bildung von Fehlpaarungen induziert. Die Replikation wurde wie in Abschnitt 3.7. beschrieben unter Einsatz eines nicht-äquimolaren Nukleotidmix durchgeführt. Für jeden der durch Fehlpaarungen hervorgerufenen sieben Phagenphänotypen wurden zwei nicht-äquimolare Nukleotidkonzentrationen eingesetzt. Von den 14 eingesetzten Nukleotidkonzentrationen, sind hier beispielhaft zwei aufgeführt, die eine G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung induzieren. Die anderen eingesetzten Nukleotidmengen wurden analog angesetzt.

Nukleotidmix (10x) für eine G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung:

10:1	30:1
10 mM ATP, pH 7	10 mM ATP, pH 7
3 mM dGTP (Nukleotid für Fehlpaarung)	9 mM dGTP (Nukleotid für Fehlpaarung)
0,3 mM dATP (korrektes Nukleotid)	0,3 mM dATP (korrektes Nukleotid)
je 1 mM dTTP, dCTP	je 1 mM dTTP, dCTP
Lagerung bei -70°C.	Lagerung bei -70°C.

### 3.8 Die Variationen der Polymerasereaktionen

Die Replikationsreaktionen mit den eukaryotischen Polymerasen wurden durch Zugabe von verschiedenen Enzymen wie 3'-5'-Exonukleasen, Einzelstrang-Bindeprotein RPA und FEN1 variiert.

#### 3.8.1 Die Titration von 3'-5'-Exonukleasen zur Polymerasereaktion

Die Polymerasereaktion der eukaryotischen Polymerasen wurde auch in Anwesenheit verschiedener 3'-5'-Exonukleasen, TP53, APE1 und WRN, durchgeführt. Dazu wurden die Exonukleasen in folgenden molaren Verhältnissen zur Polymerase eingesetzt:

TP53: ¼; ½; 1; 2 und 5 Moleküle TP53 (Tetramer) pro Molekül Polymerase.

APE1: 1; 2 und 5 Moleküle APE1 (Monomer) pro Molekül Polymerase.

WRN: 1; 3 und 9 Moleküle WRN (Monomer) pro Molekül Polymerase.

### 3.8.2 Die Replikation in Anwesenheit von Replikationsprotein A (RPA)

Die Polymerasereaktion der eukaryotischen Polymerasen wurde auch in Anwesenheit des Einzelstrang-Bindeproteins RPA durchgeführt. Das RPA wurde auf einzelsträngiger  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA im Massenverhältnis von 4:1 eingesetzt, d.h. ca. ein Drittel der DNA waren mit RPA bedeckt. Auf dem doppelsträngigen Substrat mit einer Lücke in der Region des Amber-Codons wurde RPA im Massenverhältnis von 1:1 zur Polymerase, d.h. ein Molekül RPA (Trimer) pro Lücke eingesetzt. In den Reaktionen zur Okazaki-Fragment-Prozessierung mit Pol  $\delta$ -HE wurde RPA in einem Massenverhältnis von 2,25:1 zur ssDNA eingesetzt, d.h. ca. 1/6,5 der DNA war mit RPA bedeckt.

### 3.8.3 Die Replikation in Anwesenheit von FEN1

Einige Polymerasereaktionen wurden in Anwesenheit von hFEN1 durchgeführt. Dazu wurden ein Molekül hFEN1 (Monomer) pro Molekül DNA eingesetzt.

## 3.9 Die Präparation von Sphäroplasten (Benzinger *et al.*, 1971)

Gramnegative Bakterien werden in isotonischen Lösungen mit Lysozym behandelt, um ihren Mureinsacculus abzubauen. Die entstehenden partiell zellwandfreien Bakterien (Sphäroplasten) sind bei Verwendung entsprechender Stabilisatoren auf Eis mehrere Tage aufnahmebereit für DNA.

Mit einer Kolonie *E. coli* C600 wurde eine 12 h-Kultur (LB-Medium) angeimpft. Mit 2 ml der 12 h-Kultur wurden 200 ml LB-Medium, das mit 80  $\mu$ l Thiamin (10 mg/ml) versetzt war, angeimpft und bei 3°C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 erfolgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation (1000 x g bei Raumtemperatur, Beckman, Rotor JA-14). Die Zellen wurden in 1 ml 1 M Saccharose resuspendiert. Anschließend wurden folgende Lösungen zugesetzt: 600 ml 30-%iges BSA (Biotest), 600 ml 30-%iges BSA (Sigma, A8577) und 400  $\mu$ l 4-%iges (w/v) EDTA. Mit 120  $\mu$ l 1 mg/ml Lysozym (in 0,25 M Tris/HCl pH 8,1, frisch angesetzt) erfolgte eine Inkubation von 2 min. Dieser Ansatz wurde mit 28 ml PA-Medium verdünnt und 12 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nacheinander wurden folgende Lösungen zugesetzt: 600  $\mu$ l 10-%iges (w/v) MgSO<sub>4</sub>, 75  $\mu$ l 1-%iges (w/v) Protaminsulfat und 50  $\mu$ l 250 mg/ml Spermin-Cl<sub>4</sub> (wobei die beiden letzten Lösungen vor Gebrauch frisch angesetzt wurden). Nach einer Lagerung von 4 Tagen auf Eis waren die Sphäroplasten kompetent.

### 3.10 Die Transfektion der Sphäroplasten

Von der DNA der Replikationsansätze wurde eine Verdünnungsreihe ( $10^4$ - $10^5$ ) mit Tris/HCl (50 mM, pH 8,1) angelegt. 10  $\mu$ l der DNA-Verdünnung, 400  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl pH 8,1 und 400  $\mu$ l Sphäroplasten wurden vermischt und für 10 min bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 250  $\mu$ l Indikatorbakterien ( $OD_{600} \sim 0,6$ ) und 2,5 ml flüssigem Top-Agar (50°C) und das Gemisch wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten mit dem Suppressorstamm *E. coli* CQ2 wurden bei 37°C für 3-4 h und die Platten mit dem Wildtypstamm *E. coli* C bei 30°C 12 h inkubiert. Nach dieser Inkubationsdauer ließen sich die durch Lyse der Bakterien verursachten Plaques auszählen.

### 3.11 Die phänotypische Charakterisierung der Revertanten

Zur Ermittlung der Reversionsfrequenz in den unter "nucleotide pool bias"-Bedingungen durchgeführten Experimenten musste der Phänotyp der einzelnen Phagen bestimmt werden. Dazu wurden die Plaques auf den *E. coli* C-Wildtypplatten nach Inkubation bei 30°C in drei Gruppen klassifiziert: Klein, mittel, groß. Aus diesen Klassen wurden jeweils drei Plaques phänotypisch charakterisiert. Die entsprechenden Phagen wurden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in 500  $\mu$ l 50 mM Natriumborat pH 8,3 aufgenommen. Je 100  $\mu$ l einer 1:500 verdünnten Phagenlösung wurden wieder mit *E. coli* C Bakterien ausplattiert und bei 30°C und 38°C inkubiert. Phagen, die bei beiden Temperaturen große Plaques bildeten, wurden als wildtypähnlich eingestuft. Dazu gehören *ts*<sub>42</sub>, *ts*<sub>43</sub>,  *$\psi$ wt* und *wt*. Phagen, die bei 38°C und 30°C Plaques mittlerer Größe erzeugten, wurden als *ts*<sub>38</sub> eingeordnet. Phagen, die bei 38°C kein Wachstum zeigten und bei 30°C kleine Plaques bildeten, gehörten zu den Gruppen *ts*<sub>34</sub> und *ts*<sub>35</sub>. Durch eine wiederholte Inkubation bei den jeweiligen Temperaturen konnten die Phagen eindeutig zugeordnet werden.

### 3.12 Die Berechnung der Über-Alles-Genauigkeit und der Fehlerausbeute

Die Replikationsgenauigkeit einer Polymerase wurde als sog. Über-Alles-Genauigkeit bestimmt. Die Berechnung erfolgte aus der in einem Transfektionsexperiment (vgl. 1.7) ermittelten Reversionsfrequenz (Zahl der Revertanten / Gesamtzahl Phagen) und berücksichtigte die Fehlerausbeute. Die Über-Alles-Genauigkeit ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Über-Alles-Genauigkeit} = \text{Reversionsfrequenz} / \text{Fehlerausbeute}$$

Die Einbeziehung der Fehlerausbeute ist nötig, da die phänotypische Expressionsrate einer Fehlpaarung der *in vivo* Replikation der Phagen-DNA in der transfizierten *E. coli* Zelle unterliegt. Auch ist die postreplikative Reparatur in den transfizierten *E. coli* Zellen für die Fehlerausbeute von Bedeutung (Kramer *et al.*, 1984). Die Fehlerausbeute wurde mittels der Korrekturprimer, die am Amber-Codon eine G:T<sub>Matrixe</sub>-Fehlpaarung als Marker induzieren bestimmt. Auf die  $\Phi$ X174 $am16$ -ssDNA wurde der Korrekturprimer 1 bzw. auf das Substrat mit einer Lücke der Korrekturprimer 2 hybridisiert, mit der Polymerase elongiert und das Produkt ligiert. Im Transfektionsexperiment ließ sich die Fehlerausbeute aus dem Verhältnis von Revertanten zur Gesamtzahl der Phagen bestimmen (Weber & Große, 1989).

Für jede Polymerase und in allen Transfektionsexperimenten wurde die Fehlerausbeute parallel zu den untersuchten Proben ermittelt und in die Berechnung der Genauigkeit einbezogen.

Nach mehrfach wiederholten *in vitro* Replikationsreaktionen und anschließenden Transfektionsexperimenten ließ sich die Standardabweichung der Über-Alles-Genauigkeit aus durchschnittlich 3-5 unabhängigen Experimenten berechnen.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte *in vitro* die Möglichkeit eines intermolekularen 3'-5'-Korrekturlesens durch die autonomen Exonukleasen Tumorsuppressorprotein P53 (TP53), Werner Protein (WRN) und Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) bei der Elongationsreaktion von Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim) und der Reparatursynthese von Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) untersucht werden. In einigen Reaktionen wurden auch akzessorische Proteine berücksichtigt.

Ein weiterer Schwerpunkt war die *in vitro* Rekonstitution der Okazaki-Fragment-Prozessierung mit rekombinanten Proteinen im Hinblick auf ein funktionelles 5'-3'-Korrekturlesen. Es wurde ein System etabliert, das die Detektion einer, mit der Okazaki-Fragment-Prozessierung assoziierten, 5'-3'-Fehlerkorrektur erlaubte.

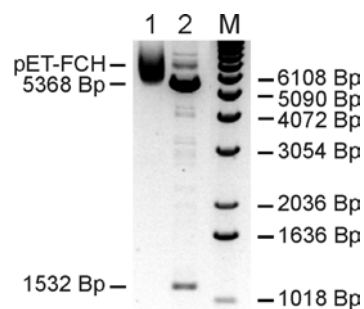
Voraussetzung für alle Untersuchungen war das Vorliegen geeigneter gereinigter Proteine, die teils zur Verfügung standen (vgl. 2.6) und teils im Rahmen dieser Arbeit exprimiert und gereinigt wurden.

### 4.1 Die Expression und Reinigung von rekombinantem FEN1

In diesem Abschnitt wird die Reinigung des Expressionsvektors und die Expression und Reinigung der rekombinanten, humanen Flap-Endonuklease 1 (FEN1) beschrieben, die in der Rekonstitution der "long-patch" Basen-Exzisionsreparatur (BER) und Okazaki-Fragment-Prozessierung eingesetzt wurde.

#### 4.1.1 Die Reinigung des Expressionsvektors von FEN1

Der Expressionsvektor pET-FCH (pET 28b mit hFEN1; Nolan *et al.*, 1996) für hFEN1 (His-tag) wurde aufgereinigt (vgl. 3.4.3). Das gereinigte Plasmid wurde zur Kontrolle einem Restriktionsverdau mit *Nco*I und *Bam*HI unterzogen (Abb. 6).



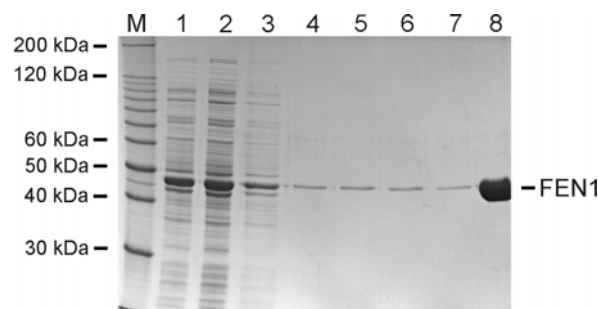
#### Abb. 6 : Der Restriktionsverdau des hFEN1-Expressionsvektors

Mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI wurde der Expressionsvektor pET-FCH hydrolysiert. Bahn 1: pET-FCH-Vektor, Bahn 2: Produkte des Restriktionsverdau, M: Marker, DNA-Längenstandard X (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

Die beiden Restriktionsenzyme (*NcoI* und *BamHI*) flankieren das Gen des hFEN1 im Vektor. Die erhaltenen zwei linearen DNA-Fragmente besaßen die erwartete Größe des Plasmids pET28b (Novagen) mit 5368 Bp und des hFEN1-Gens mit 1532 Bp.

#### 4.1.2 Die Reinigung von FEN1

Das hFEN1 (His-tag) wurde über eine Talonsäule gereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 3.1.1; 3.1.2; Abb. 7). Das Molekulargewicht von hFEN1 beträgt 42,5 kDa (Nolan *et al.*, 1996).



**Abb. 7 : Gereinigtes rekombinantes, humanes FEN1**

Die Analyse des gereinigten hFEN1 mittels eines Coomassie gefärbten SDS-Proteingels. Bahn 1: Rohextrakt, Bahn 2: Überstand Talonsäule, Bahn 3-7: Waschfraktionen, Bahn 8: Elution von hFEN1 (His-tag) von der Talonsäule, M: Marker 10 kDa Proteinleiter (Gibco BRL).

Die Ausbeute betrug ~200 µg gereinigtes hFEN1 aus 500 ml eingesetzter Expressionskultur.

## 4.2 Die Aktivitätstests für Exo- und Endonukleasen

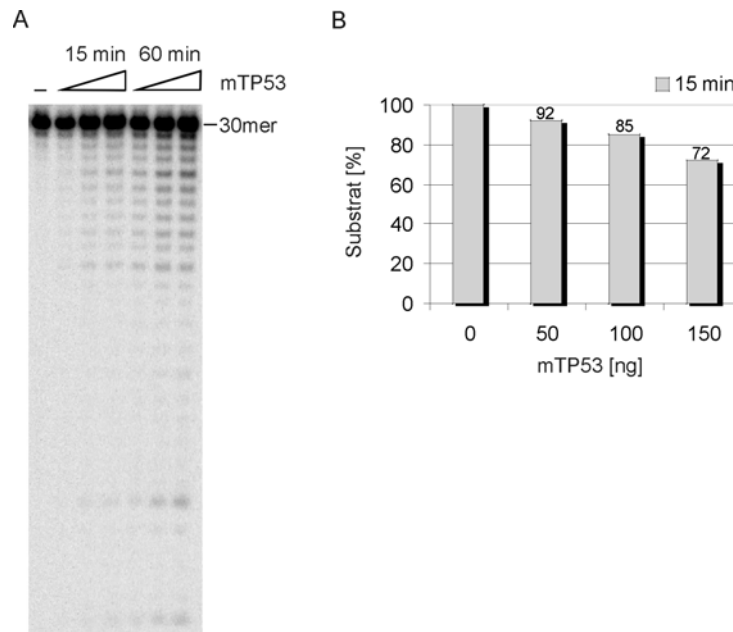
Voraussetzung zur Untersuchung der Exo- und Endonukleasen im Genauigkeitsassay auf eine potenzielle Rolle als externe 3'-5'-Korrekturleser für Pol  $\alpha$ -Prim bzw. Pol  $\beta$  oder auf eine Funktion bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung, war eine Überprüfung der charakteristischen enzymatischen Eigenschaften der eingesetzten Nukleasen in Aktivitätstests (vgl. 2.9, 3.3).

### 4.2.1 Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von TP53

Für das Tumorsuppressorprotein P53 ist eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität beschrieben worden (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

Das rekombinante mTP53 zeigte in einem Exonukleaseassay mit einem 5'-radioaktiv markierten 30mer Oligonukleotidsubstrat eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Abb. 8A). Die Reaktionsprodukte sind als sog. "Abbauleiter" detektierbar, die auf eine nicht-pro

zessive Exzision der Nukleotide vom 3'-Ende hindeuteten. Auch bovines und murines TP53 waren auf diesem DNA-Substrat exonukleolytisch aktiv (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 8 : Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von TP53.**

(A) Murines TP53 (His-tag) wurde 15 bzw. 60 min mit 150 Bq 5'-<sup>32</sup>P-markiertem 30mer Oligonukleotid inkubiert. Es wurden 50; 100 und 150 ng TP53 eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Harnstoffgel aufgetrennt. (B) Nach der Detektion im Phosphorimager wurde der Abbau des Ausgangssubstrats quantifiziert.

Der DNA-Abbau war sowohl von der Reaktionszeit als auch der Konzentration des eingesetzten TP53 abhängig. In Abb. 8B ist der lineare Zusammenhang von Substratabbau im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge am Beispiel der Reaktionsdauer von 15 min dargestellt.

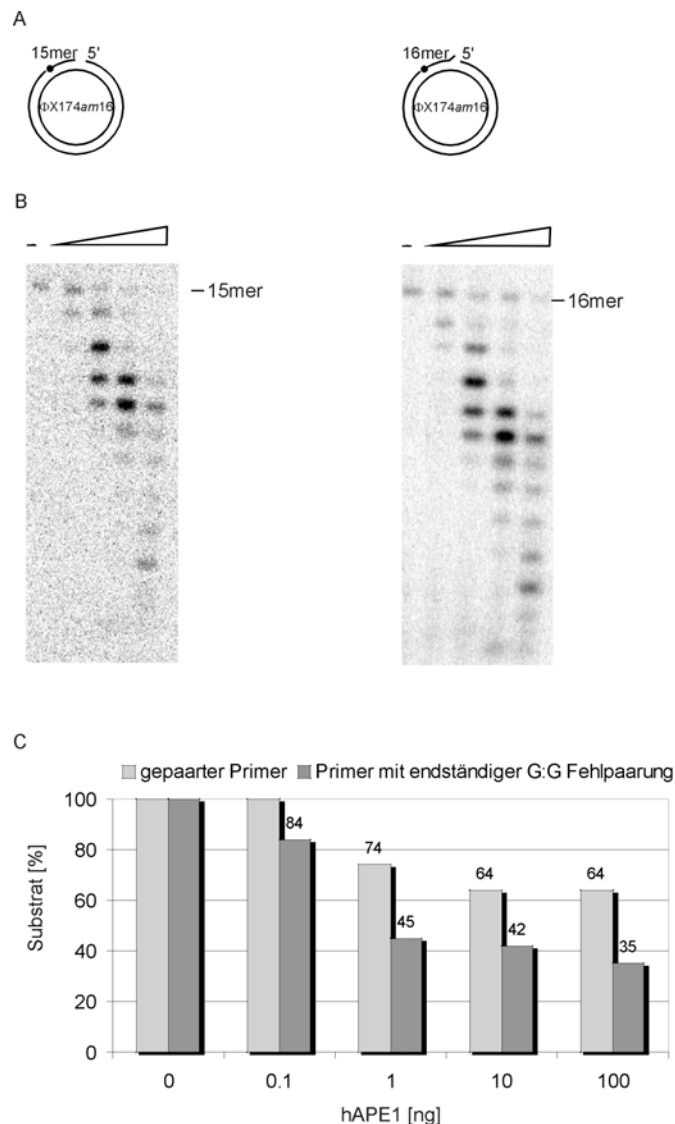
#### 4.2.2 Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von APE1

Die multifunktionale humane Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 besitzt auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die das Antitumor-Nukleosid-Analogon  $\beta$ -L-Dioxolan-Cytidin vom 3'-Ende einer Duplex-DNA entfernt (Chou *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass hAPE1 auch fehlgepaarte Nukleotide vom 3'-Ende eines dsDNA-Substrats mit einem Einzelstrangbruch ("nick") oder einer Lücke ("gap") entfernen kann (Chou & Cheng, 2002).

Die Exonukleaseaktivität des hAPE1 wurde auf zirkulären dsDNA-Substraten des Phagen  $\Phi$ X174am16 mit einer Lücke von fünf bzw. sechs Nukleotiden untersucht (Abb. 9A). In die 21 Nukleotide umfassende Lücke der Phagen-Matrize wurden ein



5'-markierter Primer (15mer) mit korrekter Basenpaarung hybridisiert, so dass eine Lücke von 6 Nt verblieb. Analog dazu wurde auch ein 16mer Primer eingesetzt, der eine endständige G:G-Fehlpaarung provozierte und eine Lücke von 5 Nt freilie (vgl. 2.9, Tab. 4). Auf beiden DNA-Substraten war eine, von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängige, 3'-5'-Exonukleaseaktivität der hAPE1 detektierbar (Abb. 9B).



### Abb. 9 : Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von APE1

Humanes APE1 (Novus) wurde 10 min mit 150 Bq 5'-<sup>32</sup>P-markiertem Primer eines Substrats (A) aus Primer (gepaart oder am 3'-Ende mit G:G-Fehlpaarung) und Matrize (dsDNA  $\Phi$ X174am16) inkubiert. (B) Es wurden 0; 0,1; 1; 10 und 100 ng APE1 eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels eines Harnstoffgels getrennt und nach der autoradiographischen Detektion mit einem Phosphoimager wurde (C) die Substratbande quantifiziert.

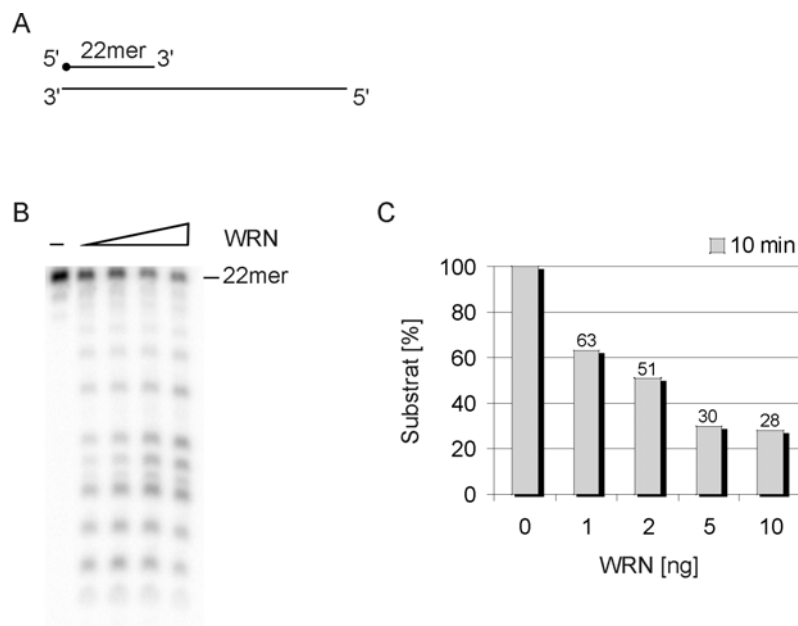
Die quantitative Analyse des Abbaus des Ausgangssubstrats deutet daraufhin, dass das fehlgepaarte Substrat scheinbar bevorzugt abgebaut wurde (Abb. 9C). Allerdings ist bekannt, dass die Exonukleaseaktivität von APE1 bevorzugt fehlgepaarte Nukleotide entfernt und umgekehrt proportional zur Größe der Lücke in der DNA ist (Chou &

Cheng, 2002). Der scheinbar bevorzugte Abbau des fehlgepaarten Substrats (Abb. 9C) könnte somit möglicherweise auf einen tatsächlich stärkeren Abbau der Fehlpaarung im Vergleich zur korrekten Basenpaarung und / oder die geringere Größe der Lücke zurückzuführen sein.

#### 4.2.3 Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von WRN

Für das Werner Protein ist neben einer Helikaseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität beschrieben worden (Huang *et al.*, 1998; Kamath-Loeb *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998a; Huang *et al.*, 2000). Die exonukleolytische Aktivität wird deutlich von ATP stimuliert (Kamath-Loeb *et al.*, 1998).

Das Werner Protein zeigte auf einem linearen dsDNA-Substrat (vgl. 2.9, Tab. 4) mit einem 5'-markierten Primer und einem rezessiven 3'-Ende mit einer OH-Gruppe (Abb. 10A) eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Abb. 10B). Der Substratabbau ist in Abb. 10C quantitativ dargestellt.



#### Abb. 10 : Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von WRN

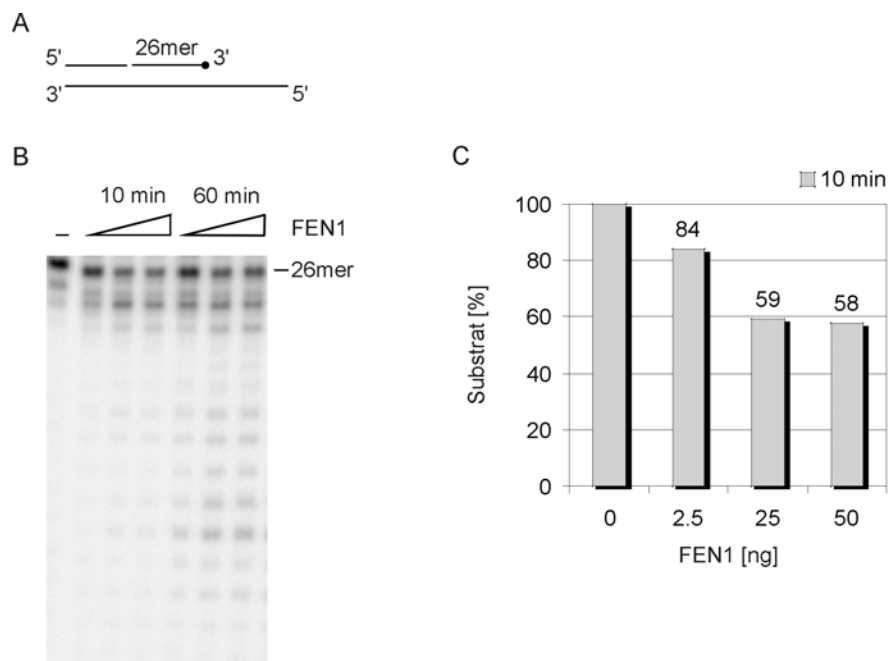
Humanes WRN wurde 10 min mit 150 Bq 5'-<sup>32</sup>P-markiertem Primer eines Substrats (A) aus Primer und Matrize inkubiert. (B) Es wurden 0; 1; 2; 5 und 10 ng WRN eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels eines Harnstoffgels getrennt und nach der autoradiographischen Detektion mit einem Phosphoimager wurde (C) die Substratbande quantifiziert.

Die Produkte der DNA-Degradation bilden eine "Abbauleiter", die auf einen distributiven Abbaumodus und die Freisetzung von 5'-Desoxynukleosid-Monophosphaten hindeutet (Abb. 10B).

#### 4.2.4 Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von FEN1

Die Flap-Endonuklease 1 besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die dsDNA mit einem Einzelstrangbruch ("nick"), und mit geringerer Effektivität dsDNA mit einer Lücke und glattem oder rezessivem 5'-Ende abbaut (Lindahl, 1971; Harrington & Lieber, 1994; Lyamichev *et al.*, 1993; Murante *et al.*, 1994; Alleva & Doetsch, 1998).

Das im Exonukleasetest eingesetzte lineare dsDNA-Substrat (vgl. 2.9, Tab. 4) besteht aus zwei Primern, die auf eine lange Matrize hybridisiert wurden. Zwischen den beiden Primern befindet sich ein "nick". Der stromabwärts vom "nick" befindliche Primer ist am 3'-Ende radioaktiv markiert (Abb. 11A).



#### Abb. 11 : Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von FEN1

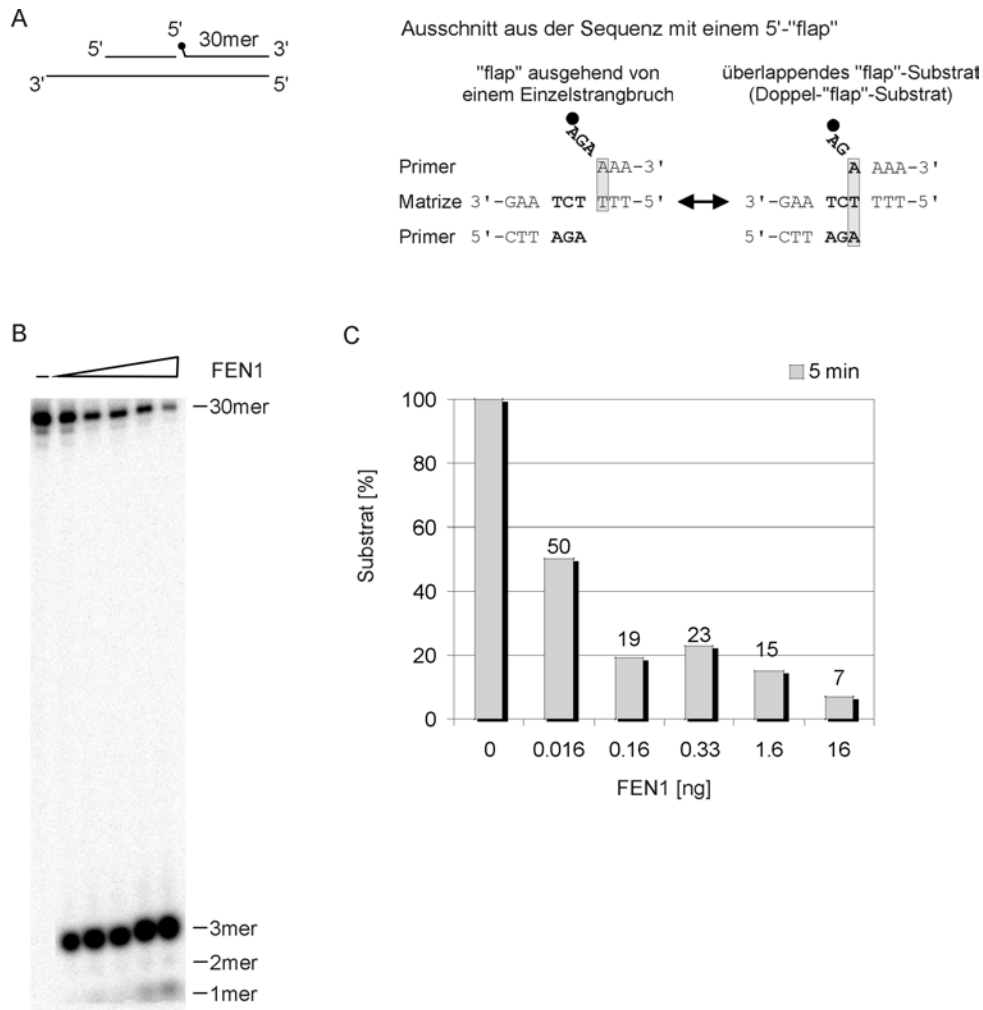
Gereinigtes humanes FEN1 wurde 10 bzw. 60 min mit 150 Bq eines 3'-<sup>32</sup>P-markierten Substrats (A) inkubiert. (B) Es wurden 0; 2,5; 25 und 50 ng FEN1 in dieser Reaktion eingesetzt. Die Produkte wurden mittels eines Harnstoffgels getrennt und mit dem Phosphoimager detektiert. (C) Der Abbau der Substratbande wurde für die zehninminütige Reaktion quantifiziert.

Auf dem DNA-Substrat war ausgehend vom "nick" eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität des hFEN1 nachweisbar (Abb. 11B). Die DNA-Abbauprodukte traten in Form einer "Abbauleiter" auf, die auf einen distributiven Abbau des Substrats hindeuten. Die Effektivität des Substratabbaus ist in Abb. 11C quantitativ dargestellt.

#### 4.2.5 Die 5'-3'-Endonukleaseaktivität von FEN1

Neben der 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt Flap-Endonuklease 1 eine 5'-3'-Endonukleaseaktivität (Harrington & Lieber, 1994; Murante *et al.*, 1994). Sie schneidet dsDNA, die einen ungepaarten Einzelstrang, eine sog. 5'-"flap"-Struktur aufweist und mit geringerer Effektivität auch Pseudo-Y-Strukturen (Lieber, 1997). Kürzlich wurde beschrieben, dass FEN1 aus *S. cerevisiae* (Rad27) *in vitro* sehr effizient Doppel-"flap"-Strukturen schneidet, die neben dem 5'-"flap" des stromabwärts gelegenen Primers auch ein ungepaartes Nukleotid am 3'-Ende des stromaufwärts befindlichen Primers besitzen (Kao *et al.*, 2002). In einer aktuellen Studie wird auch für humanes FEN1 das Doppel-"flap"-Substrat als optimal für die Endonuklease beschrieben (Friedrich-Heineken *et al.* 2003).

Das hier eingesetzte Testsubstrat besteht aus zwei Primern, die nebeneinander auf eine Matrize hybridisiert wurden (vgl. 2.9, Tab. 5). Beide Primer waren komplementär zur Matrize und wiesen eine partiell überlappende Sequenz von 3 Nukleotiden auf. Die Verwendung von Substraten mit komplementären "flaps" berücksichtigt die Situation, wie sie *in vivo* bei der Reparatur oder Okazaki-Fragment-Prozessierung auftritt. Die überlappenden Regionen am 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Primers und am 3'-Ende des stromaufwärts gelegenen Primers konkurrieren um die gleiche Positionen der Matrize, so dass sich durch Strang-Verdrängung und Strang-Verschiebung ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen DNA-Substraten ausbilden kann. Es kann beispielsweise ein Substrat ausgehend von einem Einzelstrangbruch mit einem 3 Nt umfassenden 5'- oder 3'-"flap" entstehen, wobei letzterer nicht von FEN1 geschnitten wird (Lieber, 1997). Außerdem kann sich eine sogenannte überlappende "flap"-Struktur oder Doppel-"flap"-Struktur bilden, d.h. es entsteht ein 2 Nt umfassender 3'- oder 5'-"flap" und die stromaufwärts und -abwärts gelegenen Primer überlappen sich um ein Nukleotid. Der stromabwärts hybridisierte Primer ist am 5'-Ende radioaktiv markiert (Abb. 12A). In einer Detailansicht sind zwei der möglicherweise entstehenden 5'-"flap"-Substrate dargestellt (Abb. 12A).



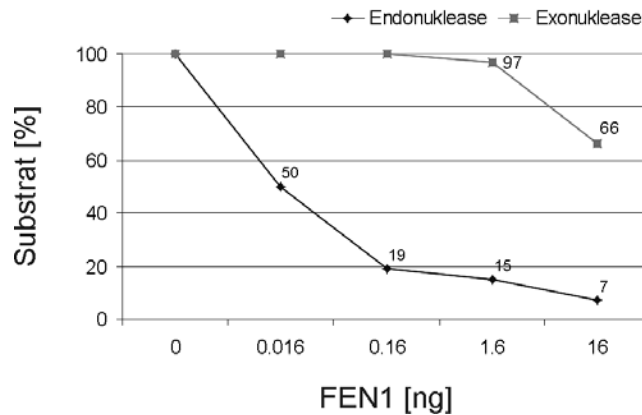
### Abb. 12 : Die 5'-3'-Endonuklease aktivität von FEN1

Gereinigtes humanes FEN1 wurde mit 150 Bq eines 5'-<sup>32</sup>P-markiertem "flap"-Substrats inkubiert (A). Ein Ausschnitt des Testsubstrats gibt die Sequenzüberlappungen der Primer und zwei der möglicherweise entstehenden Intermediate wieder. Die Größe des einzelsträngigen Bereichs ("flap") umfasste maximal 3 Nucleotide (Details s.h. Text). (B) Es wurden 0; 0,016; 0,16; 0,33; 1,6 und 16 ng FEN1 in dieser Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Harnstoffgel aufgetrennt. (C) Die Banden wurden mit einem Phosphoimager detektiert und der Abbau der Substratbande quantifiziert.

Auf dem eingesetzten "flap"-Testsubstrat war eine 5'-3'-Endonukleaseaktivität des hFEN1, die einen 5'-markierten "flap" vom Substrat abtrennte, detektierbar (Abb. 12B). Es waren drei verschiedene Produktlängen feststellbar, wobei eine Bande allerdings deutlich dominierte (3mer Oligonucleotid). Die Detektion eines vorherrschenden Produkts deutet daraufhin, dass das eingesetzte Testsubstrat Intermediate bildete und von diesen eines bevorzugt von hFEN1 geschnitten wurde. Die Quantifizierung des Substratabbaus ist in Abb. 12C dargestellt.

Die Aktivität der beiden enzymatischen Eigenschaften von hFEN1 wurde vergleichend untersucht (Abb. 13). Die Exonukleaseaktivität wurde auf dsDNA mit einem Einzel

strangbruch (vgl. Abb. 11A) und die Endonukleaseaktivität auf dsDNA mit einem "flap" bestimmt (vgl. Abb. 12A).



**Abb. 13 : Vergleich der Exo- und Endonukleaseaktivität von FEN1**

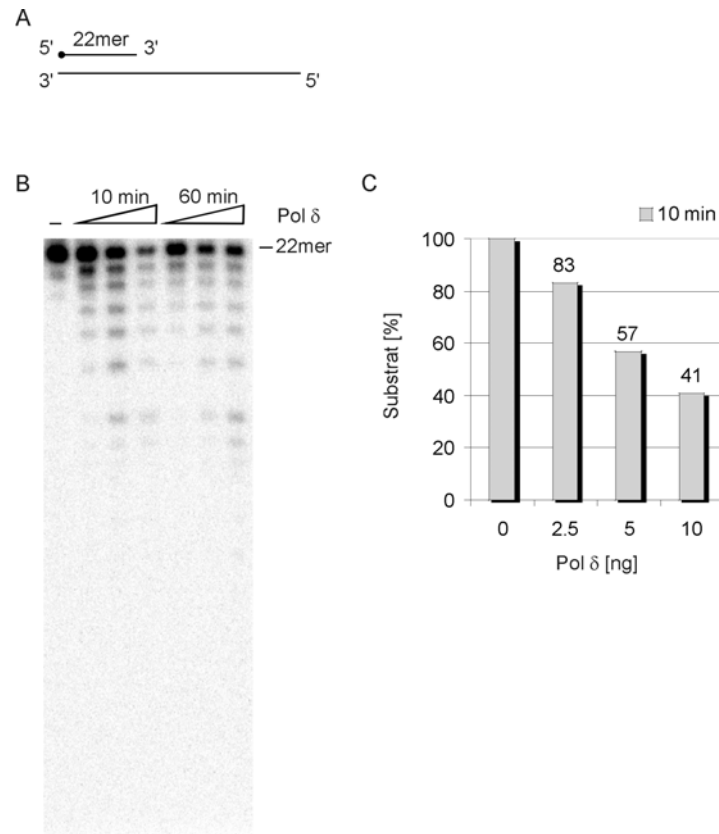
Die Aktivitäten der 5'-3'-Exonuklease auf dsDNA mit einem "nick" und der 5'-3'-Endonuklease auf "flap"-dsDNA wurden miteinander verglichen. Es wurden 0; 0,016; 0,16; 1,6 und 16 ng hFEN1 in diese Reaktionen (5 min) eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Harnstoffgel aufgetrennt und mit einem Phosphoimager detektiert. Der Abbau der Substratbande wurde quantifiziert und halblogarithmisch dargestellt.

Der Substratabbau wurde für beide Nukleaseaktivitäten quantifiziert und es zeigte sich, dass die 5'-3'-Endonukleaseaktivität von hFEN1 scheinbar stärker als die 5'-3'-Exonukleaseaktivität war (Abb. 13). Um ca. die Hälfte des Ausgangssubstrats exonukleolytisch abzubauen wurden ~1000-fach höhere Konzentrationen von hFEN1 benötigt als für einen endonukleolytischen Substratabbau.

**4.2.6 Die 3'-5'-"Proofreading"-Exonuklease von Polymerase  $\delta$**

DNA-Polymerase  $\delta$  (*S. cerevisiae*) besitzt neben der 5'-3'-Polymerase eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die als intrinsische Korrektorexonuklease bezeichnet wurde (Morrison *et al.*; 1991; Simon *et al.*, 1991). Auch für die pentamere Pol  $\delta$  aus *S. pombe* ist eine 3'-5'-Proofreading-Exonuklease beschrieben worden (Chen *et al.*, 2000).

Hier wurde die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der tetrameren hPol  $\delta$  auf einem Primer / Matrize-Substrat (vgl. 2.9, Tab. 4) mit einem rezessiven 3'-Ende untersucht (Abb. 14A).



**Abb. 14 : Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der intrinsischen Korrektorexonuklease von Polymerase  $\delta$**

(A) Humane Pol  $\delta$  wurde für 10 bzw. 60 min mit 150 Bq  $5'$ - $^{32}$ P-markiertem Primer eines Substrats aus Primer / Matrize inkubiert. (B) Es wurden 2,5; 5 und 10 ng Pol  $\delta$  eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels eines Harnstoffgels aufgetrennt und mit einem Phosphorimager detektiert. (C) Der Abbau des Substrats wurde quantifiziert.

Der Abbau des  $5'$ -radioaktiv markierten Primers erfolgte distributiv vom  $3'$ -Ende (Abb. 14B). Der Substratabbau wurde für die 10-minütige Reaktionsdauer quantifiziert (Abb. 14C).

Die hier dargestellten Experimente zur Exo- und Endonukleaseaktivität von TP53, WRN, APE1, FEN1 und Pol  $\delta$  zeigten, dass die Proteine in aktiver Form vorlagen und geeignet waren, in den nachfolgenden Studien zu deren Einfluss auf die Genauigkeit verschiedener Polymerasen bzw. auf die Okazaki-Fragment-Prozessierung eingesetzt zu werden. Die autonomen 3'-5'-Exonukleasen (TP53, WRN, APE1) wurden auf eine potenzielle Korrekturlesefunktion für von Pol  $\alpha$ -Prim und Pol  $\beta$  induzierte Fehlpaarungen überprüft. Polymerase  $\delta$ -Holoenzym (Pol  $\delta$ -HE) und die 5'-3'-Endonuklease FEN1 wurden auf eine funktionelle Interaktion zur 5'-3'-Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung untersucht.

### 4.3 Die Gewinnung der $\Phi$ X174am16-DNA-Substrate

Voraussetzung für das Studium der DNA-Replikation *in vitro* ist das Vorliegen einer geeigneten DNA-Matrize. In Frage kommt einzelsträngige und partiell doppelsträngige DNA, die als Modell für Replikationsintermediate dienen kann. Der in dieser Arbeit eingesetzte Assay zur Genauigkeitsmessung von Polymerasen (vgl. 1.7) beruht auf der Vermehrung des Phagen  $\Phi$ X174am16, dessen DNA für die *in vitro* Replikationen eingesetzt wurde. Im Folgenden ist die Präparation der DNA-Matrizen dargestellt.

#### 4.3.1 Die Aufreinigung einzelsträngiger $\Phi$ X174am16-DNA

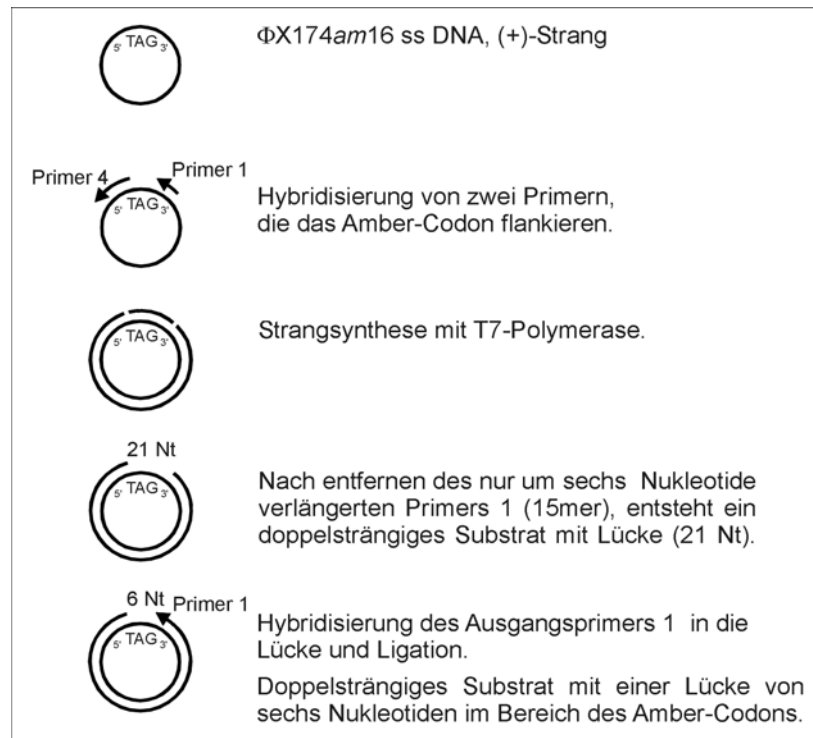
Die Aufreinigung der  $\Phi$ X174am16-ssDNA erfolgte wie in Abschnitt 3.5 beschrieben. Die Infektiosität der  $\Phi$ X174am16-ssDNA wurde gegenüber dem Suppressorstamm (*E. coli* CQ2) und dem Wildtypstamm (*E. coli* C) untersucht. Nur auf dem Suppressorstamm konnte die Infektion von Bakterienzellen beobachtet werden, bedingt durch das vorhandene Amber-Stoppocodon in der DNA.

Die spontane Mutationsrate einzelsträngiger  $\Phi$ X174am16-DNA wurde im Transfektionsexperiment (vgl. 1.7) mit  $6 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6}$  (ein Fehler pro 167000 bzw. 250000 Bp) bestimmt und war somit niedrig genug, um die Detektion von Polymerase induzierten Basensubstitutionen zu ermöglichen.

#### 4.3.2 Die Konstruktion eines doppelsträngigen $\Phi$ X174am16-DNA-Substrats

Die Konstruktion eines partiell doppelsträngigen DNA-Substrates erfolgte ausgehend von der  $\Phi$ X174am16-Einzelstrang-DNA, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben. Das entstandene dsDNA-Substrat wies einen einzelsträngigen Bereich von 21 Nukleotiden (Lücke) in der Region des Amber-Codons auf. Durch Hybridisierung und Ligation des ursprünglich eingesetzten, stromaufwärts vom Amber-Codon gelegenen Primers 1 ließ sich die Lücke in dem dsDNA-Substrat auf sechs Nukleotide verkleinern (Abb. 15).





**Abb. 15 : Die Konstruktion des doppelsträngigen  $\Phi X174am16$ -DNA-Substrats mit einem einzelsträngigen Bereich in der Region des Amber-Codons.**

Die Herstellung eines dsDNA-Substrats mit einer Lücke von 21 bzw. sechs Nucleotiden im Bereich des Amber-Codons. Mit dem Einsatz verschiedener Primer konnte die Größe der Lücke variiert werden (Details s.h. Text).

Zur Herstellung eines DNA-Substrates mit einer größeren Lücke (32 Nt) wurde analog vorgegangen und anstelle des Primers 1 der Primer 2 verwendet. Der stromaufwärts vom Amber-Codon gelegene Primer 2 (16mer) hybridisierte nicht direkt vor dem TAG-Codon sondern war zehn Nucleotide weiter stromaufwärts positioniert, so dass eine größere Lücke erzielt werden konnte.

Das Vorhandensein des einzelsträngigen Bereichs in diesen dsDNA-Substraten wurde im Transfektionsexperiment (vgl. 1.7) überprüft. Die messbare Fehlerhäufigkeit entsprach mit  $7 \times 10^{-6}$  (ein Fehler pro 143000 Bp) eher der einer einzelsträngigen DNA (vgl. 4.3.1) und nicht der von T7-Pol (vgl. 4.5, Abb. 19).

#### 4.3.3 Die Sequenzen doppelsträngiger DNA-Substrate

Der Einfluss von autonomen 3'-5'-Exonukleasen auf die Genauigkeit der Pol  $\beta$  wurde *in vitro* mit rekombinanten Proteinen unter näherungsweise rekonstituierten "long-patch" Basen-Exzisionsreparatur-Bedingungen untersucht. Dazu wurden partiell doppelsträngige DNA-Substrate mit einem einzelsträngigen Bereich (Lücke) in der Region des Amber-Codons hergestellt (vgl. 4.3.2). Die Lücke umfasste sechs Nucleotide. Damit

auch der Einsatz ssDNA-bindender akzessorischer Proteine möglich war, wurde auch ein Substrat mit einer Lücke von 32 Nukleotiden eingesetzt. Die DNA wies keine apurinen / apyrimidinen Stellen (AP-Stellen) auf. In Abb. 16 sind die Sequenzen der verwendeten Substrate aufgeführt.

A Substrat mit einer Lücke von sechs Nukleotiden in Position AB 5273-5278.

3' TCT CTA CTC ← CGA CCC TTT TCA ATG 5' Primer 1  
5' AGA GAT GAG ATT TAG GCT GGG AAA AGT TAC 3' (+)-Strang  $\Phi$ X174am16

B Substrat mit einer Lücke von 32 Nukleotiden in Position AB 5273-5304.

3' CTC ← A AAA 5'  
5' GAG ATT TAG GCT GGG AAA AGT TAC TGT AGC CGA CGT TTT 3' (+)-Strang

**Abb. 16 : Die Sequenzen der doppelsträngigen  $\Phi$ X174am16-DNA-Substrate mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons**

Ausschnitt der Sequenzen der partiell doppelsträngigen DNA-Substrate mit unterschiedlich großen einzelsträngigen Bereichen in der Region des Amber-Codons. Der Pfeil zeigt die Richtung der DNA-Synthese an. (A) Substrat mit einer Lücke von 6 Nt und (B) Substrate mit einer Lücke von 32 Nt für die Rekonstitution der "long-patch" BER mit Pol  $\beta$ .

#### 4.4 Die *in vitro* Replikation mit Polymerasen

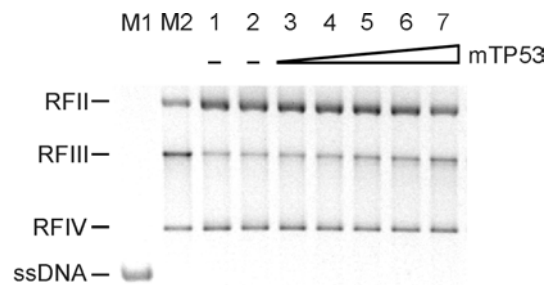
In diesem Abschnitt wird auf die *in vitro* Replikation von  $\Phi$ X174am16-DNA mit den eukaryotischen DNA-Polymerasen Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim) und Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) näher eingegangen.

##### 4.4.1 Die *in vitro* Replikation von $\Phi$ X174am16-DNA mit Pol $\alpha$ -Prim

Ausgehend von der  $\Phi$ X174am16-ssDNA synthetisierten die eingesetzten Polymerasen in einer Primer initiierten Reaktion unter Verwendung der dNTPs den komplementären DNA-Strang (vgl. 3.7.1). Auf dem mit einer Lücke versehenen dsDNA-Substrat verlief die Replikation analog. Pol  $\alpha$ -Prim konnte die Replikation auch *de novo* auf ssDNA starten. Sie synthetisierte unter Verwendung von rNTPs einen RNA-Primer und elongierte diesen anschließend mit dNTPs. Die ssDNA bzw. dsDNA mit Lücke wurde vollständig in die doppelsträngigen replikativen Formen RFII (offen zirkulär) und RFIII (linear) und in Anwesenheit von Ligase auch in RFIV (geschlossen zirkulär) überführt. Das Auftreten der RFIII-Bande ist auf die bei der Präparation der einzelsträngigen zirkulären DNA ebenfalls anfallende lineare DNA zurückzuführen. Ligase schließt den Einzelstrangbruch ("nick") im neu synthetisierten Strang der RFII durch Knüpfung einer Phosphodiesterbindung, so dass die RFIV entsteht. Bei der Produktanalyse auf einem

1-%igen Agarosegel ermöglicht die Gegenwart von EthBr in Gel und Laufpuffer die Auftrennung der RFII und RFIV als zwei distinkte Banden.

In Abb. 17 sind am Beispiel einer Replikationsreaktion mit hPol  $\alpha$ -Prim in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von mTP53 und in Anwesenheit von T4-Ligase die drei replikativen Formen dargestellt.



**Abb. 17 : Die *in vitro* Replikation einzelsträngiger  $\Phi$ X174am16-DNA mit hPol  $\alpha$ -Prim in Anwesenheit von mTP53**

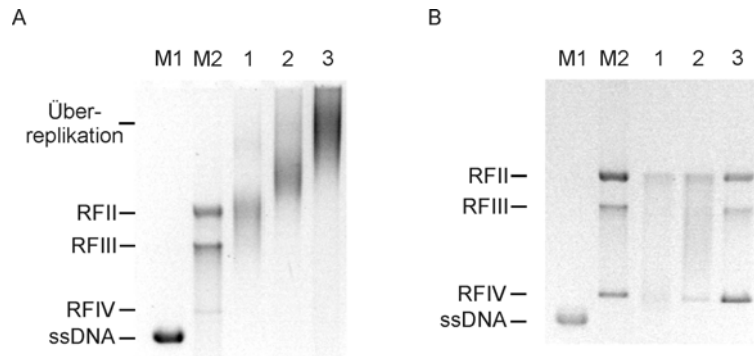
Die Primer initiierte Replikation von  $\Phi$ X174am16-ssDNA mit rekombinanter hPol  $\alpha$ -Prim und steigenden Konzentrationen von mTP53. Das rekombinante mTP53 wurde in Konzentration von  $\frac{1}{4}$ ;  $\frac{1}{2}$ ; 1; 2 und 5 Moleküle mTP53 (Tetramer) pro Molekül hPol  $\alpha$ -Prim eingesetzt (Bahn 3-7). Die Konzentrationen der dNTPs waren äquimolar. In Bahn 1 und Bahn 3-7 wurde Primer 1, in Bahn 2 der Korrekturprimer 1 zur Bestimmung der Fehlerausbeute eingesetzt. M1: Marker  $\Phi$ X174am16-ssDNA; M2: Marker, replikative Formen RFII, RFIII, RFIV von  $\Phi$ X174am16. Die Produktanalyse erfolgte auf einem 1-%igen Agarosegel mit 0,2  $\mu$ g/ml EthBr in Gel und Laufpuffer.

Eine vollständige Überführung der RFII in RFIV konnte nicht erreicht werden (Abb. 17), da hPol  $\alpha$ -Prim die Reaktion teilweise kurz vor Erreichen des ursprünglichen Primers abbrach und diese Lücke von wenigen Nukleotiden im neusynthetisierten Strang von der Ligase nicht geschlossen werden konnte (Reckmann *et al.*, 1985).

**4.4.2 Die *in vitro* Replikation von  $\Phi$ X174am16-DNA mit Pol  $\beta$**

Pol  $\beta$  ist im Gegensatz zur Pol  $\alpha$ -Prim (vgl. 4.4.1) befähigt, nach vollständiger Replikation eines zirkulären DNA-Substrats das 5'-Ende des ursprünglichen Primers von der Matrize zu verdrängen und die DNA-Synthese fortzusetzen (Wang & Korn, 1980; Randahl *et al.*, 1988). Dieses Phänomen wird als Überreplikation oder "strand displacement"-Synthese bezeichnet. Eine Überreplikation ließ sich durch das Abstoppen der Reaktion zu einem geeigneten Zeitpunkt weitgehend vermeiden (Abb. 18A, Bahn 1). Die nach längerer Reaktionsdauer gebildeten Produkte der Überreplikation lassen sich oberhalb der RFII im Agarosegel detektieren (Abb. 18A, Bahn 2 u. 3). Die

Zugabe von T4-Ligase ermöglichte eine Ligation der replizierten DNA zur RFIV (Abb. 18B).



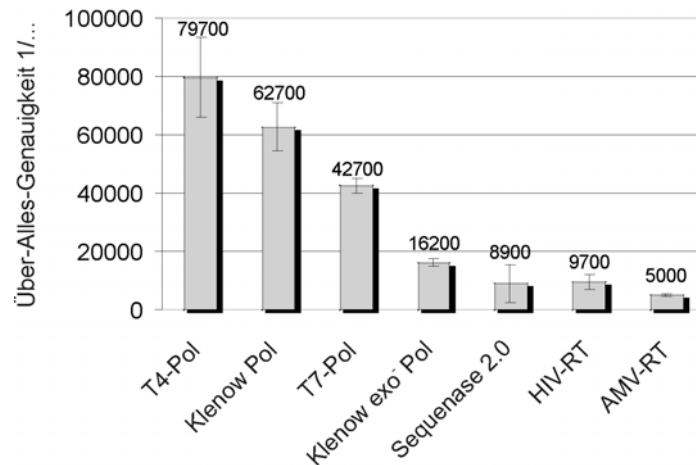
**Abb. 18 : Die *in vitro*-Replikation von  $\Phi$ X174am16-ssDNA mit hPol  $\beta$**

Die Replikation von ssDNA mit rekombinanter hPol  $\beta$  (30 Moleküle Pol  $\beta$  / Molekül ssDNA). Die Proben wurden nach 3, 6 und 12 h abgestoppt und analysiert (Bahn 1-3) (A) Überreplikation mit Pol  $\beta$ . (B) Replikation der DNA und Ligation zur RFVI in Anwesenheit von T4-Ligase. M1: Marker  $\Phi$ X174am16-ssDNA; M2: Marker, replikative Formen RFII, RFIII, RFIV von  $\Phi$ X174am16. Die Produktanalyse erfolgte auf einem 1-%igen Agarosegel mit 0,2  $\mu$ g/ml EthBr in Gel und Laufpuffer.

Nach vollständiger Replikation wurde die dsDNA zur Transfektion von *E. coli* C600 Sphäroplasten eingesetzt. In den Transfektionsexperimenten zur Replikationsgenauigkeit von Polymerasen mit autonomen 3'-5'-Exonukleasen wurde auf den Einsatz überreplizierter DNA verzichtet, um mit RFII und RFIV unter standardisierten Bedingungen in allen Experimenten ähnliche Transfektionseffizienzen zu erzielen. Auch sollte eine eventuelle Stimulation der Reparatursysteme in den *E. coli* Sphäroplasten vermieden werden, die durch die Transfektion überreplizierter DNA-Produkte hervorgerufen werden könnte.

**4.5 Die Genauigkeiten verschiedener Polymerasen im  $\Phi$ X174am16-Reversionssystem**

Zur Überprüfung, ob das  $\Phi$ X174am16-Reversionssystem eine geeignete Methode zur Bestimmung der Genauigkeit von Polymerasen darstellt, wurden einige virale und bakterielle Polymerasen und zwei Reverse Transkriptasen in diesem System untersucht (Abb. 19). In diesem und allen weiteren Balkendiagrammen wurde die errechnete Über-Alles-Genauigkeit (vgl. 3.12) als "ein Fehler pro Anzahl replizierter Basen (1/...)" angegeben, wobei die Zahl der replizierten Basen oberhalb der Balken vermerkt ist.



**Abb. 19 : Die Genauigkeit viraler und bakterieller Polymerasen**

Die Über-Alles-Genauigkeiten von Klenow Polymerase, Klenow exo<sup>-</sup> Polymerase, T7-Polymerase, Sequenase Version 2.0, T4-Polymerase, HIV-Reverse Transkriptase und AMV-Reverse Transkriptase auf  $\Phi$ X174 $am$ 16-ssDNA. Die Experimente wurden 3-4-mal unabhängig voneinander wiederholt.

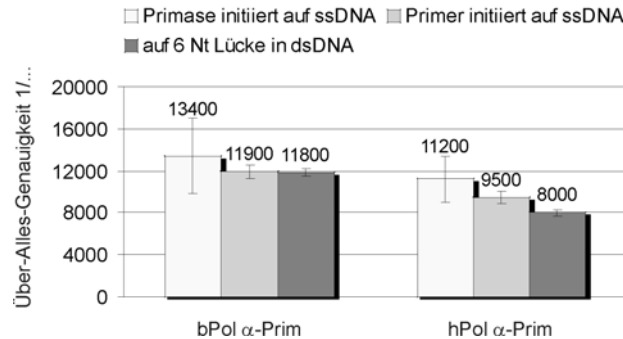
Polymerasen mit einer intrinsischen 3'-5'-Exonukleaseaktivität (T4-Pol, T7-Pol, Klenow Pol) zeigten in diesem System generell eine höhere Über-Alles-Genauigkeit als Polymerasen, denen diese Korrekturfunktion fehlte (Sequenase Version 2.0, Klenow exo<sup>-</sup> Pol) (Abb. 19). Ebenfalls war evident, dass die Polymerasen mit einer intrinsischen 3'-5'-Exonukleasefunktion im Vergleich zur korrespondierenden Exonuklease-defizienten Polymerase (z.B. T7-Pol zu Sequenase Version 2.0; Klenow Pol zu Klenow exo<sup>-</sup> Pol) eine höhere Replikationsgenauigkeit aufwiesen.

Die Reversen Transkriptasen ohne Korrekturfunktion (HIV-RT, AMV-RT) besaßen, wie erwartet, eine sehr niedrige Replikationsgenauigkeit, vergleichbar einer Exonuklease-defizienten Polymerase (z.B. Sequenase Version 2.0; Abb. 19).

#### 4.6 Die Genauigkeit von Polymerase $\alpha$ -Primase im $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversions-system

Die Replikationsgenauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim, die keine intrinsische 3'-5'-Korrektorexonuklease besitzt, wurde im  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem bestimmt. Pol  $\alpha$ -Prim startet die DNA-Synthese *de novo* auf Leit- und Folgestrang (vgl. 1.2) und ist auch an DNA-Reparaturereignissen beteiligt (Saxena *et al.*, 1990; Oda *et al.*, 1996; Holmes & Haber, 1999). Um diese beiden Situationen zu berücksichtigen, wurde die Replikationsgenauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim sowohl auf ssDNA in einer Primase und Primer initiierten Reaktion, als auch auf partiell doppelsträngiger DNA ermittelt.

Eingesetzt wurde Pol  $\alpha$ -Prim verschiedener Herkunft, bovine Pol  $\alpha$ -Prim aus Kalbsthymus und rekombinante, humane, in Insektenzellen exprimierte Pol  $\alpha$ -Prim (vgl. 2.6, Tab. 1). In Abb. 20 sind die erhaltenen Werte in einem Diagramm zusammengefasst.



**Abb. 20 : Die Genauigkeit von bPol  $\alpha$ -Prim und hPol  $\alpha$ -Prim auf ssDNA und auf dsDNA mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons**

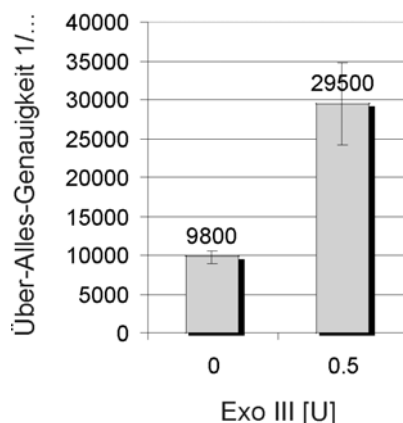
Die Über-Alles-Genauigkeit boviner Pol  $\alpha$ -Prim und rekombinanter, humaner Pol  $\alpha$ -Prim in einer Primase und einer Primer initiierten Reaktion auf ssDNA und auf partiell doppelsträngiger DNA. In den Reaktionen wurde 1 Molekül Polymerase pro Molekül DNA-Substrat eingesetzt. Die Experimente wurden 5-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Wie in Abb. 20 dargestellt, betrug die Über-Alles-Genauigkeit der bPol  $\alpha$ -Prim in der Primase initiierten Reaktion 1/13400, in der Primer initiierten Reaktion 1/11900 und auf der dsDNA mit Lücke 1/11800, d.h. ein fehlgepaartes Nukleotid trat pro 13400 bzw. 11900 bzw. 11800 replizierte Basen auf. Die Genauigkeit war in der Primase initiierten Reaktion also geringfügig höher als in den beiden anderen Reaktionen, aber unter Berücksichtigung der Standardabweichung war dieser Effekt nicht signifikant.

Für hPol  $\alpha$ -Prim wurden sehr ähnliche Werte erhalten. Für diese Ergebnisse war es ohne Bedeutung, ob der verwendete Primer direkt vor dem Amber-Codon oder im Abstand von 10 Nt davor auf der ssDNA hybridisierte. Die unterschiedliche Herkunft der Pol  $\alpha$ -Prim und die Art des verwendeten DNA-Substrats waren für die Replikationsgenauigkeit in diesem Messsystem ohne Bedeutung.

Die Pol  $\alpha$ -Prim replizierte auf den eingesetzten DNA-Substraten die Matrize mit einer relativ hohen Ungenauigkeit von einer fehlgepaarten Base auf 8000-13400 eingebauten Nukleotiden. Mit diesen Werten ist die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim mit denen der Exonuklease-defizienten Sequenase Version 2.0 und Klenow  $exo^-$  Polymerase vergleichbar (Abb. 19). Wie erwartet, synthetisierte Pol  $\alpha$ -Prim die DNA auf Grund der fehlenden intrinsischen Korrektorexonuklease mit relativ hoher Ungenauigkeit und war daher für Studien zur Funktion von autonomen 3'-5'-Exonukleasen als externe "Proofreader" geeignet.

Es wurde überprüft, ob in dem  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem die, von einer autonomen 3'-5'-Exonuklease herbeigeführte, Genauigkeitserhöhung einer Polymerase detektierbar ist. Zu diesem Zweck wurde die *E. coli* Exonuklease III (Exo III) eingesetzt. Sie besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die auf Primer / Matrize-Substraten mit rezessivem gepaarten oder ungepaarten 3'-Ende aktiv ist (Kornberg & Baker, 1992). In Abb. 21 ist die von Exo III bei hPol  $\alpha$ -Prim herbeigeführte Genauigkeitserhöhung dargestellt.



**Abb. 21 : Der Einfluss von Exo III auf die Genauigkeit humaner Pol  $\alpha$ -Prim**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\alpha$ -Prim in einer Primer initiierten Reaktion auf ssDNA. In der Reaktion wurden 0,5 U *E. coli* Exonuklease III (NEB) eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Die Zugabe von Exo III zu einer Replikationsreaktion mit hPol  $\alpha$ -Prim führte unter Berücksichtigung der Standardabweichung zu einer Genauigkeitserhöhung um den Faktor 2-3 (Abb. 21).

#### **4.7 Die Replikationsgenauigkeit von Polymerase $\alpha$ -Primase in Anwesenheit autonomer 3'-5'-Exonukleasen**

In der Zelle führt eine niedrige Replikationsgenauigkeit zur Anhäufung von Fehlern und damit zur genomischen Instabilität, welche in einem erhöhten Krebsrisiko resultiert (Cahill *et al.*, 1999; Loeb, 1998). Pol  $\alpha$ -Prim, der eine intrinsische Korrektorexonuklease fehlt, repliziert die DNA mit relativ hoher Ungenauigkeit (vgl. 4.6). Es sollte die Hypothese näher betrachtet werden, dass das Tumorsuppressorprotein P53 bzw. das Werner Protein als externe Korrektorexonukleasen für Polymerasen agieren können (vgl. 1.8). Dafür wurde das  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem in einer Elongationsreaktion der Pol  $\alpha$ -Prim verwendet. Die Replikationsgenauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim wurde nach

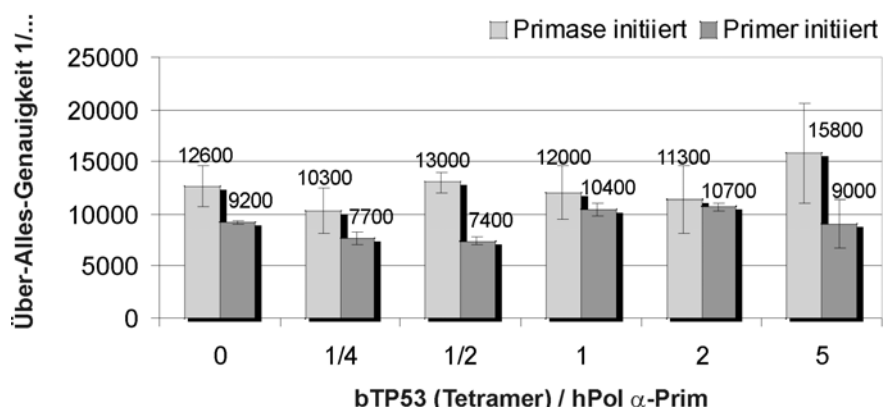
Titration mit dem 3'-5'-exonukleolytisch aktiven TP53 und WRN (vgl. 4.2.1; 4.2.3) auf einzelsträngigen und / oder partiell doppelsträngigen DNA-Substraten des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 $am$ 16 untersucht.

#### 4.7.1 Die Genauigkeit von Pol $\alpha$ -Prim nach Titration mit TP53

Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass TP53 *in vitro* an Pol  $\alpha$ -Prim binden kann (Kühn *et al.*, 1999). In wie weit auch eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine möglich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert. Dazu wurde untersucht, ob die 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Tumorsuppressorproteins P53 die Über-Alles-Genauigkeit humaner, rekombinanter Pol  $\alpha$ -Prim bzw. boviner Pol  $\alpha$ -Prim auf  $\Phi$ X174 $am$ 16-DNA durch den Ausbau fehlgepaarter Nukleotide beeinflusst. Zum Einsatz kam TP53 verschiedener Spezies, das in unterschiedlichen Expressionssystemen exprimiert worden war (vgl. 2.6, Tab. 1). Die Replikationen wurden mit einem Primer gestartet oder waren Primase initiiert. Einige Reaktionen wurden auch in Anwesenheit des Einzelstrang-Bindeproteins RPA durchgeführt.

##### 4.7.1.1 Die Genauigkeit von humaner Pol $\alpha$ -Prim nach Titration mit TP53

Die Replikationsgenauigkeit der hPol  $\alpha$ -Prim wurde mit steigenden Mengen bTP53 in einer Primase und einer Primer initiierten Reaktion auf  $\Phi$ X174 $am$ 16-ssDNA untersucht (Abb. 22).



**Abb. 22 : Der Einfluss von bovine m TP53 auf die Genauigkeit humaner Pol  $\alpha$ -Prim**

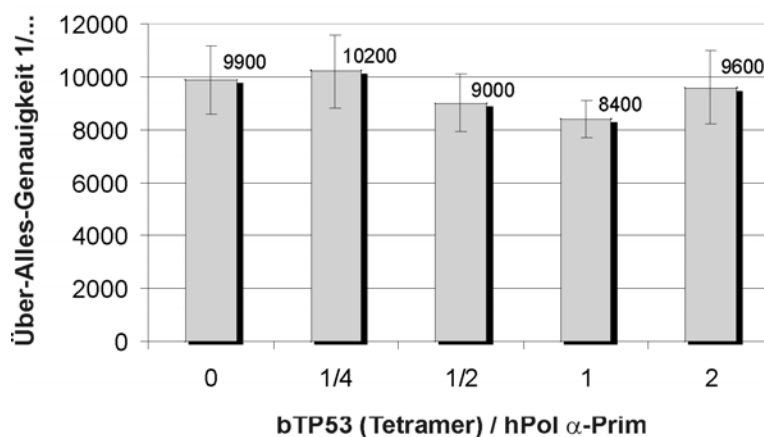
Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\alpha$ -Prim in einer Primase initiierten Replikation und einer Primer initiierten Reaktion auf ssDNA. In der Reaktion wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 und 5 Moleküle GST-bTP53 (Tetramer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim zugegeben. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.



Die Über-Alles-Genauigkeit der hPol  $\alpha$ -Prim blieb auch in Anwesenheit des bTP53 unverändert (Abb. 22). Die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim war in der Primase initiierten Reaktion geringfügig, aber nicht signifikant höher als in der Primer gestarteten Reaktion. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Primase und Primer initiierten Reaktionen mit mTP53 beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Da RPA *in vivo* die zu replizierende ssDNA bedeckt und stabilisiert, wurde die Genauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim auf ssDNA auch in Anwesenheit vom Einzelstrang-Bindeprotein hRPA ermittelt. Das hRPA bindet über die große Untereinheit (70 kDa) als Heterotrimer bevorzugt an ssDNA (Wold *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1994). Außerdem wurde hRPA eingesetzt, um zu klären, welche Auswirkungen es als akzessorischer Faktor auf die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim haben könnte, da hRPA über die Primase-Untereinheit mit der Pol  $\alpha$ -Prim interagiert (Nasheuer *et al.*, 1992; Dornreiter *et al.*, 1992) und ihre Aktivität stimuliert (Kenny *et al.*, 1989; Mitsis *et al.*, 1993). In einer Studie erhöht RPA in einem "gap-filling" Assay die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim vierfach (Carty *et al.*, 1992), in anderen Studien zeigt es hingegen keinen Einfluss auf die Genauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim (Kunkel *et al.*, 1991) oder nur geringe Auswirkungen auf die Häufigkeit von Leseraster-Mutationen der Pol  $\alpha$ -Prim aus Hefe (Roberts *et al.*, 1990). Kürzlich wurden Hinweise gefunden, dass RPA den Pol  $\alpha$ -Prim-Komplex stabilisiert, als sog. Polymerase-Klammer wirkt und den Einbau von Fehlern durch Pol  $\alpha$ -Prim signifikant reduziert (Maga *et al.*, 2001a). Des Weiteren wurde hRPA im Genauigkeitsassay mit Pol  $\alpha$ -Prim und TP53 im Hinblick auf eine physikalische Interaktion von hRPA mit TP53 (Dutta *et al.*, 1993; He *et al.*, 1993; Li & Botchan, 1993) eingesetzt, die eventuell Auswirkungen auf ein potenzielles Korrekturlesen durch TP53 haben könnte.

Das hRPA wurde in einem Massenverhältnis von 4:1 zur ssDNA eingesetzt, so dass ein Drittel der ssDNA bedeckt war (Abb. 23). Unter diesen Bedingungen war eine Initiation der Replikation gewährleistet im Gegensatz zu einer vollständigen Bedeckung der DNA mit hRPA, die die Primaseaktivität inhibiert und eine Initiation der Replikation unterbindet (Atrazhev *et al.*, 1992).

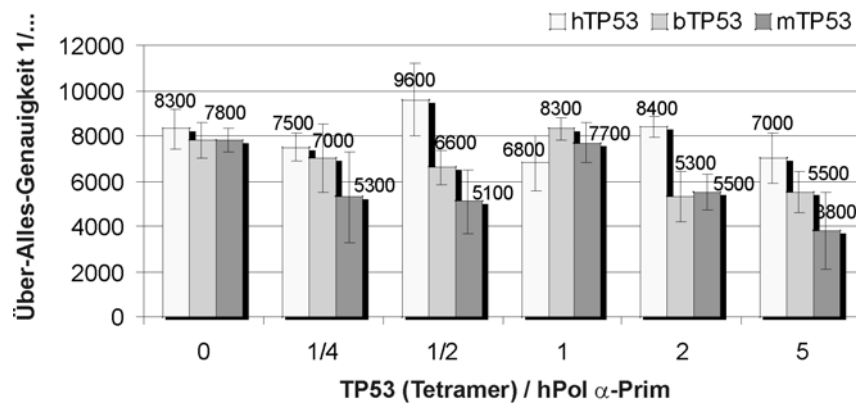


**Abb. 23 : Der Einfluss von bovinem TP53 auf die Genauigkeit humaner Pol  $\alpha$ -Prim in Anwesenheit von RPA in einer Primase initiierten Reaktion**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\alpha$ -Prim in einer Primase initiierten Replikation. Das Einzelstrang bindende Protein hRPA wurde im Massenverhältnis 4:1 zur ssDNA eingesetzt, d.h. ein Drittel der ssDNA war mit hRPA bedeckt. In der Reaktion wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2 Moleküle GST-bTP53 (Tetramer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim eingesetzt. Die Experimente wurden unabhängig voneinander 3-mal wiederholt.

Wie in Abb. 23 dargestellt, war die Replikationsgenauigkeit der hPol  $\alpha$ -Prim in der Primase initiierten Reaktion in Gegenwart von hRPA mit den entsprechenden Werten in der Reaktion ohne RPA vergleichbar (Abb. 22). Auch war in Anwesenheit von hRPA kein Korrekturlesen der 3'-5'-Exonukleaseaktivität des bTP53 für Fehler der hPol  $\alpha$ -Prim zu beobachten (Abb. 23).

Da es für Pol  $\alpha$ -Prim Hinweise auf eine Beteiligung an DNA-Reparaturereignissen gibt (Saxena *et al.*, 1990; Oda *et al.*, 1996; Holmes & Haber, 1999), wurde die Genauigkeit auch auf dsDNA mit einer Lücke, wie sie als Reparaturintermediat in der Zelle vorkommen kann, ermittelt. Die Über-Alles-Genauigkeit der hPol  $\alpha$ -Prim wurde in Anwesenheit von bTP53, mTP53 und hTP53 auf einem doppelsträngigen DNA-Substrat des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 $am$ 16 mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons, untersucht (Abb. 24).



**Abb. 24 : Der Einfluss von TP53 a auf die Genauigkeit humaner Pol  $\alpha$ -Prim**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\alpha$ -Prim auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von rekombinantem, humanem TP53 und rekombinantem, bovinem und murinem TP53 (His-tag). In der Reaktion wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 und 5 Moleküle TP53 (Tetramer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim eingesetzt. Die Experimente wurden unabhängig voneinander 3-mal wiederholt.

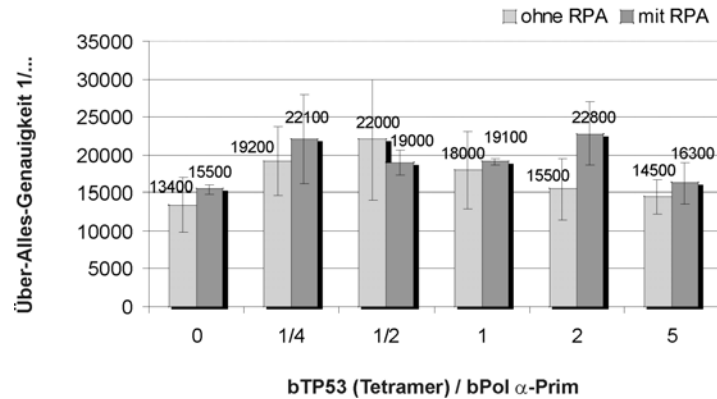
Wie in Abb. 24 dargestellt, übte das TP53 verschiedener Spezies auch auf partiell doppelsträngigem DNA-Substrat keinen Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit der Polymerase aus.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass unabhängig vom eingesetzten DNA-Substrat, die Zugabe von bTP53, mTP53 und hTP53 zu keiner Erhöhung der Über-Alles-Genauigkeit der hPol  $\alpha$ -Prim führte. TP53 agierte in diesen Experimenten offenbar nicht in der Funktion eines externen Korrekturlesers für die hPol  $\alpha$ -Prim.

In den bisher durchgeführten Experimenten stammten Polymerase und 3'-5'-Exonuklease meist aus verschiedenen Spezies (Ausnahme hPol  $\alpha$ -Prim und hTP53 in Abb. 24). Für eine funktionelle Interaktion von Polymerase und 3'-5'-Exonuklease, die zu einem effektiven Proofreading führt, ist möglicherweise die Herkunft aus der gleichen Spezies eine Voraussetzung.

#### 4.7.1.2 Die Genauigkeit boviner Pol $\alpha$ -Prim nach Titration mit TP53

Auf ssDNA wurde die Replikationsgenauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim aus Kalbsthymus mit steigenden Mengen bTP53 (His-tag) untersucht, d.h. beide Enzyme stammten aus der gleichen Spezies. In Abb. 25 sind Primase initiierte Reaktionen in An- und Abwesenheit des Einzelstrang-Bindeproteins hRPA (vgl. 4.7.1.1) dargestellt.

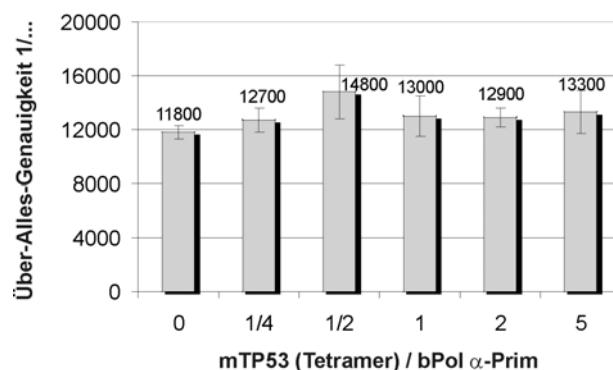


**Abb. 25 : Der Einfluss von bovinem TP53 auf die Genauigkeit boviner Pol  $\alpha$ -Prim in einer Primase initiierten Reaktion**

Die Über-Alles-Genauigkeit von boviner Pol  $\alpha$ -Prim auf Primase initiiertter ssDNA nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von rekombinantem, bovinem GST-TP53. In den Reaktionen wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 und 5 Moleküle bTP53 (Tetramer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim eingesetzt. In Reaktionen in Gegenwart vom Einzelstrang-Bindeprotein hRPA wurde es im Massenverhältnis 4:1 zur ssDNA eingesetzt, d.h. ein Drittel der ssDNA war mit hRPA bedeckt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Die Über-Alles-Genauigkeit der bPol  $\alpha$ -Prim (in An- und Abwesenheit von hRPA) erhöhte sich mit steigenden Mengen bTP53 und sank bei höheren Konzentrationen bTP53 wieder auf den Ausgangswert ab (Abb. 25). Aber unter Berücksichtigung der Standardabweichungen wurde jedoch klar, dass diese Erhöhung als nicht signifikant zu werten war. Somit war auch unter der Voraussetzung, dass Polymerase und TP53 aus der gleichen Spezies stammen, keine Veränderung der Genauigkeit zu beobachten.

Auch der Einfluss von mTP53 (His-tag) auf bPol  $\alpha$ -Prim wurde auf partiell doppelsträngiger DNA untersucht (Abb. 26).



**Abb. 26 : Der Einfluss von murinem TP53 auf die Genauigkeit von bPol  $\alpha$ -Prim**

Die Über-Alles-Genauigkeit boviner Pol  $\alpha$ -Prim auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer 6 Nt Lücke im Bereich des Amber-Codons nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von rekombinantem, murinem TP53 (His-tag). In der Reaktion wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 und 5 Moleküle mTP53 (Tetramer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

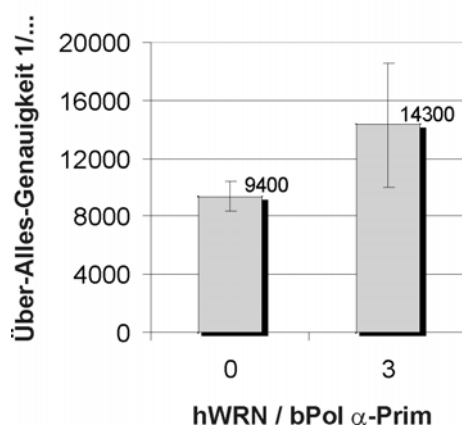
Aus Abb. 26 geht hervor, dass auch in diesem Fall TP53 ohne Einfluss auf die Genauigkeit von bPol  $\alpha$ -Prim blieb

Diese Ergebnisse belegen, dass auch bei der Titration von mTP53 und bTP53 zu bPol  $\alpha$ -Prim die Genauigkeit unbeeinflusst blieb. Auch unter der Voraussetzung, dass Pol  $\alpha$ -Prim und TP53 aus der gleichen Spezies stammen (vgl. Abb. 24, Abb. 25), war keine funktionelle Interaktion detektierbar, die zu einem effektiven Korrekturlesen führte.

#### 4.7.2 Die Genauigkeit von Pol $\alpha$ -Prim nach Zugabe von WRN

Da das Tumorsuppressorprotein P53 unter den beschriebenen Bedingungen offenbar keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim ausübte, wurden die Auswirkungen einer weiteren, humanen 3'-5'-Exonuklease, des Werner Proteins, auf die Genauigkeit, untersucht. Die Exonukleasedomäne nahe dem N-Terminus von WRN besitzt drei konservierte Motive, die eine Sequenzhomologie zu den "Proofreading"-Exonukleasedomänen von *E. coli* Pol I und *E. coli* RNase D aufweist (Mian, 1997; Moser *et al.*, 1997; Mushegian *et al.*, 1997). Dies machte WRN zu einem aussichtsreichen Kandidaten für ein externes Korrekturlesen.

Der Einfluss von hWRN auf die Genauigkeit von bPol  $\alpha$ -Prim ist in Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27 : Der Einfluss von humanem WRN auf die Genauigkeit boviner Pol  $\alpha$ -Prim**

Die Über-Alles-Genauigkeit von boviner Pol  $\alpha$ -Prim auf Primer initiiertter ssDNA nach Zugabe von rekombinantem, humanem WRN (His-tag). In der Reaktion wurden 0 und 3 Moleküle hWRN (Monomer) pro Molekül Pol  $\alpha$ -Prim eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

WRN führte zu einem leichten Anstieg der Genauigkeit (Abb. 27), was jedoch unter Einbeziehung der Standardabweichung als nicht signifikant eingestuft werden musste.

Da Fehlpaarungen nur im Falle einer Verlängerung durch eine Polymerase in einer Basensubstitution resultieren, trägt die Fähigkeit einer Polymerase zur Verlängerung von Fehlpaarungen entscheidend zur Genauigkeit bei (vgl. 1.1.1). Die verzögerte Rate der Verlängerung von Fehlpaarungen durch Pol  $\alpha$ -Prim legt die Beteiligung eines exonukleolytischen Korrekturlesens nahe (Perrino & Loeb, 1989). Außerdem ist für WRN beschrieben worden, dass eine endständige 3'-Fehlpaarung effizienter hydrolysiert wird als eine komplementäre Base (Kamath-Loeb *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen wurden die experimentellen Parameter so gewählt, dass sich am Primer eine endständige Fehlpaarung befand. Es wurde untersucht, ob WRN die Fähigkeit besitzt, die Fehlpaarung in Anwesenheit der Pol  $\alpha$ -Prim zu entfernen, bevor sie von der Polymerase verlängert werden kann. Dazu wurde ein Primer auf die einzelsträngige Matrize hybridisiert, der eine endständige G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung provozierte. Nach Zugabe von hWRN und bPol  $\alpha$ -Prim wurde die phänotypische Ausprägung dieses Fehlers bestimmt. Als Kontrolle für die generelle Fehlerausbeute dieser Fehlpaarung diente ein Experiment mit Korrekturprimer 1, der eine intrinsische G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung aufwies (vgl. 3.12) und von Pol  $\alpha$ -Prim verlängert wurde. In Tab. 7 sind die ermittelten Fehlerausbeuten zusammengefasst.

**Tab. 7 : Die Elongation eines Primers mit endständiger G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung mit bPol  $\alpha$ -Prim in Anwesenheit von hWRN**

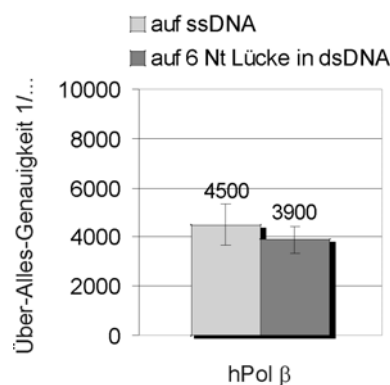
Auf einzelsträngige  $\Phi$ X174am16 wurde der Korrekturprimer 1 mit intrinsischer oder Primer 8 mit endständiger G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung hybridisiert. Die Substrate wurden zur Replikation mit bPol  $\alpha$ -Prim in Ab- und Anwesenheit von hWRN eingesetzt (Verhältnis bPol  $\alpha$ -Prim zu hWRN-Monomer 1:3). Das Verhältnis von Revertanten zur Gesamtzahl der Plaques (Fehlerausbeute) wurde bestimmt.

Enzym	Primer/ $\Phi$ X174am16-ssDNA Substrat mit G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung	Revertanten / Gesamtzahl Plaques (Fehlerausbeute)
bPol $\alpha$ -Prim	Korrekturprimer 1 (intrinsischer Fehler)	0,76
bPol $\alpha$ -Prim	Primer 8 (endständige Fehlpaarung)	0,77
bPol $\alpha$ -Prim und hWRN	Primer 8 (endständige Fehlpaarung)	0,75

In Anwesenheit von hWRN war eine hohe Fehlerausbeute detektierbar, die den Werten der beiden Kontrollexperimente entsprach. Aus diesen Werten kann auf eine vollständige Verlängerung der Fehlpaarung durch die Polymerase geschlossen werden.

#### 4.8 Die Genauigkeit von Polymerase $\beta$ im $\Phi$ X174am16-Reversionssystem

Die Pol  $\beta$  ist *in vivo* täglich an einer Vielzahl von Reparaturereignissen in der Zelle beteiligt (vgl. 1.4). Sie besitzt jedoch keine intrinsische 3'-5'-Korrektur-Exonuklease (Tanabe *et al.*, 1979). Im Hinblick auf die fehlende "Proofreading"-Exonuklease und auf die Bedeutung der Pol  $\beta$  für die Basen-Exzisionsreparatur (BER) wurde die Genauigkeit der Pol  $\beta$  im  $\Phi$ X174am16-Reversionssystem analysiert. Dazu wurde sowohl ssDNA, als auch partiell doppelsträngige DNA verwendet, die den bei der "long-patch" BER auftretenden DNA-Intermediaten mit Ausnahme der AP-Stelle entspricht (Abb. 28; vgl. 4.3). Damit wurde die Fähigkeiten der hPol  $\beta$  berücksichtigt, zum Einen DNA auf großen einzelsträngigen Molekülen in einem distributiven Modus und zum Anderen auf kurzen, wenige Nukleotide umfassenden, einzelsträngigen Bereichen in einem prozessiven Modus zu synthetisieren (Singhal & Wilson, 1993). Auf Grund dieser Eigenschaft war es möglich, hPol  $\beta$  auf partiell doppelsträngigem Substrat im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zur DNA einzusetzen, wohingegen auf ssDNA ein Überschuss von hPol  $\beta$  erforderlich war.



**Abb. 28 : Die Genauigkeit humaner Pol  $\beta$  auf ssDNA und auf dsDNA mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\beta$  auf ssDNA und partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von 6 Nt im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden auf ssDNA 30 und auf partieller dsDNA ein Molekül Pol  $\beta$  pro DNA-Matrize eingesetzt. Die Experimente wurden 4-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Wie in Abb. 28 gezeigt, replizierte die hPol  $\beta$  die ssDNA mit einer Genauigkeit von 1/4500, d.h. auf 4500 replizierte Basen wurde ein falsches Nukleotid eingebaut. Auf dem partiell doppelsträngigen Substrat war für Pol  $\beta$  eine Über-Alles-Genauigkeit von 1/3900 messbar. Die hPol  $\beta$  replizierte auf beiden Substraten, d.h. sowohl im distributiven als auch im prozessiven Replikationsmodus, die DNA mit hoher

Ungenauigkeit und war auf Grund dieser Eigenschaft für Untersuchungen zur Rolle von 3'-5'-Exonukleasen als potenzielle autonome Korrekturleser geeignet.

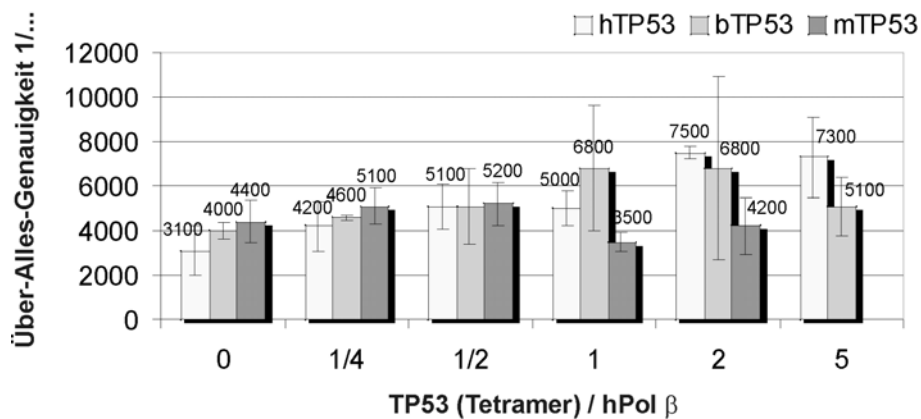
#### **4.9 Die Replikationsgenauigkeit von Polymerase $\beta$ in Anwesenheit autonomer 3'-5'-Exonukleasen**

Die niedrige Replikationsgenauigkeit der hPol  $\beta$  (vgl. 4.8), die keine intrinsische 3'-5'-Exonuklease besitzt (Tanabe *et al.*, 1979) und die Beteiligung an einer Vielzahl von BER-Ereignissen, könnten zur Einführung und Anhäufung von Mutationen im Genom führen und möglicherweise zur Tumorentstehung beitragen. Es war naheliegend zu vermuten, dass die Rolle einer fehlenden intrinsischen Korrektorexonuklease von einer oder mehreren, der erst kürzlich entdeckten, humanen, autonomen 3'-5'-Exonukleasen ausgefüllt werden könnte und die somit zur genomischen Integrität der Zelle beitragen könnten. Als potenzielle intermolekulare Korrekturleser, die mit ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität *in vitro* möglicherweise einen Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit der hPol  $\beta$  ausüben können, wurden TP53, APE1 und WRN untersucht. Als Messsystem für Pol  $\beta$  diente der  $\Phi$ X174 $am16$ -Reversionsassay, der durch die Konstruktion eines partiell doppelsträngigen Substrats optimiert wurde (vgl. 4.3.2). In den Experimenten wurde ein doppelsträngiges DNA-Substrat mit einer Lücke von sechs oder 32 Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons eingesetzt. Auf diesen Substraten konnte Pol  $\beta$  im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zur DNA eingesetzt werden (vgl. 4.8). Damit war die Voraussetzung geschaffen, auch alle weiteren verwendeten Enzyme in stöchiometrischen Verhältnissen zu Pol  $\beta$  und der DNA einzusetzen. Mit einem weiteren rekombinanten Protein, dem hFEN1, wurden näherungsweise die letzten Schritte der "long-patch" BER *in vitro* rekonstituiert und die Genauigkeit der hPol  $\beta$  unter diesen Bedingungen bestimmt.

##### **4.9.1 Die Genauigkeit von hPol $\beta$ nach der Titration mit TP53**

Die von Zhou *et al.* (2001) beschriebene physikalische Interaktion von TP53 mit Pol  $\beta$  ließ es naheliegend erscheinen, auch eine funktionelle Interaktion zwischen Polymerase und autonomer Exonuklease zur Erhöhung der Replikationsgenauigkeit zu vermuten. Es wurden unterschiedliche Mengen TP53 verschiedener Spezies eingesetzt, rekombinantes, bovines und murines TP53 (His-tag) und rekombinantes, humanes TP53 (Abb. 29).





**Abb. 29 : Der Einfluss von TP53 auf die Genauigkeit humaner Pol  $\beta$**

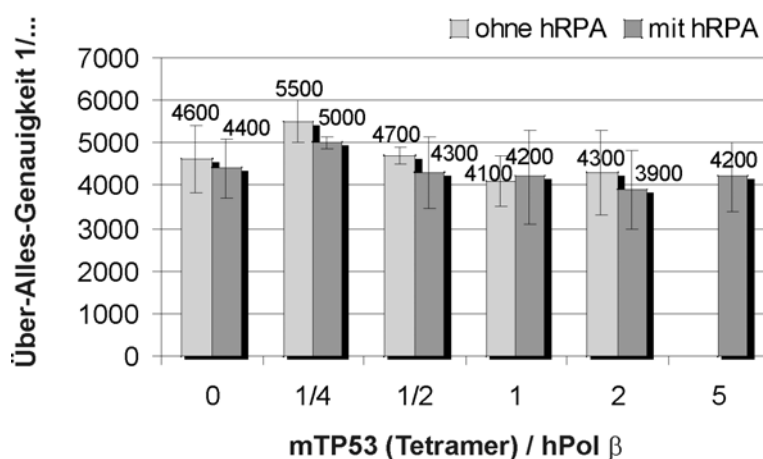
Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\beta$  auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 und 5 Moleküle rekombinantes, humanes TP53 und rekombinantes, bovines und murines TP53 (His-tag) Tetramer pro Molekül Pol  $\beta$  und pro Molekül DNA-Substrat eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Aus Abb. 29 wird deutlich, dass die steigenden Mengen mTP53 keine Veränderung und bTP53 lediglich eine geringfügige, nicht signifikante Erhöhung der Genauigkeit von hPol  $\beta$  verursachen. Auch die bei höheren Konzentrationen von hTP53 beobachtete Erhöhung der Genauigkeit um den Faktor  $\sim 2$ , sollte unter Berücksichtigung der Standardabweichung als nicht signifikant gewertet werden.

Pol  $\beta$  synthetisiert DNA *in vitro* auf Substraten mit Lücken, die nur wenige Nukleotide ( $\leq 6$ ) und eine 5'-Phosphatgruppe umfassen, in einem prozessiven Modus. Auf größeren Lücken synthetisiert sie in einem distributiven Modus (Singhal & Wilson, 1993). Die Genauigkeit der Pol  $\beta$  ist davon unbeeinflusst (Ahn *et al.*, 1998, Osheroff *et al.*, 1999, vgl. auch Abb. 28). Es wurde untersucht, ob die Exonukleaseaktivität von TP53, abhängig vom Replikationsmodus der Pol  $\beta$ , einen Einfluss auf die Über-Alles-Genauigkeit der Polymerase hat. Dazu wurde ein Substrat mit einer kleinen Lücke von sechs Nukleotiden und ein weiteres mit einer größeren Lücke von 32 Nt eingesetzt (Abb. 16). Im Vergleich der Genauigkeit von Pol  $\beta$  mit TP53 auf einer sechs Nukleotide umfassenden Lücke (Abb. 29) zu Pol  $\beta$  mit TP53 auf einer größeren Lücke (Abb. 30) zeigte sich, dass TP53 in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit der Pol  $\beta$  ausübte. Der prozessive oder distributive Replikationsmodus der Pol  $\beta$  war ohne Bedeutung für die Möglichkeit eines Korrekturlesens durch TP53.

Die Genauigkeit der hPol  $\beta$  wurde auch in Anwesenheit des Einzelstrang-Bindeproteins hRPA bestimmt, da es Hinweise auf einen Komplex von RPA und Pol  $\beta$  auf einem Substrat aus Primer / Matrize gibt (Kolpashchikov *et al.*, 2000) und dies möglicherweise Auswirkungen auf die Genauigkeit haben könnte. RPA kann in einem stabilen Modus an ssDNA binden und einen Bereich von 30 Nukleotiden bedecken (Seroussi & Lavi, 1993; Blackwell *et al.*, 1996). RPA bindet auch an einen 30 Nt umfassenden einzelsträngigen Bereich in einer Duplex-DNA, wobei die p32-Untereinheit am 3'-Ende des stromaufwärts und die p70-Untereinheit am 5'-Ende des stromabwärts befindlichen Oligonukleotids lokalisiert ist (Kolpashchikov *et al.*, 2001).

Hier wurde ein doppelsträngiges Substrat mit einer Lücke von 32 Nt verwendet, das ausreichend Raum für die Bindung eines RPA Moleküls an die einzelsträngige DNA im Bereich des Amber-Codons bot (Abb. 16). Es wurde untersucht, ob mTP53 in Anwesenheit von hRPA als Korrekturleser für Pol  $\beta$  arbeitet (Abb. 30).



**Abb. 30 : Der Einfluss von murinem TP53 auf die Genauigkeit humaner Pol  $\beta$  in Ab- und Anwesenheit von humanem RPA**

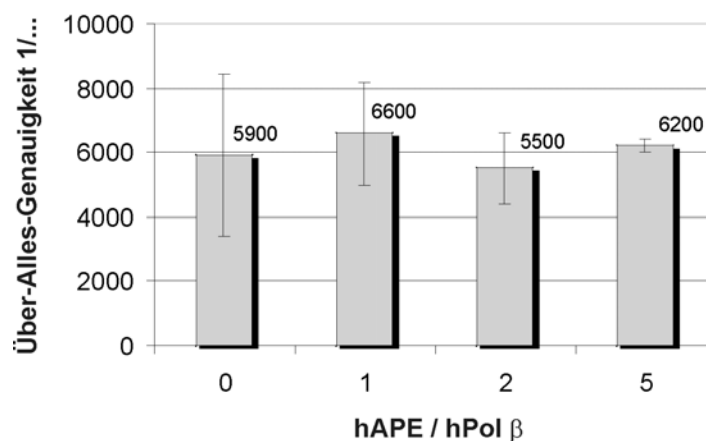
Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\beta$  auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von 32 Nt im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 5 Moleküle rekombinantes, murines TP53 (His-tag) Tetramer pro Molekül Pol  $\beta$  und pro Molekül DNA-Substrat eingesetzt. Das rekombinante, humane RPA wurde im Massenverhältnis 1:1 von RPA zu Pol  $\beta$  eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Wie in Abb. 30 gezeigt, replizierte Pol  $\beta$  die DNA in der Kontrolle ohne TP53 in An- und Abwesenheit von hRPA mit identischer Genauigkeit (1/4400; vgl. Abb. 29 und Abb. 30). Die Replikationsgenauigkeit der Pol  $\beta$  blieb auch in Gegenwart von hRPA von den steigenden Mengen TP53 unbeeinflusst.

#### 4.9.2 Die Genauigkeit von hPol $\beta$ nach der Titration mit hAPE1

Die BER ist *in vivo* eine Multienzym-Reaktion und viele der daran beteiligten Enzyme interagieren miteinander (vgl. 1.4) und üben so möglicherweise einen Einfluss auf die Genauigkeit der Pol  $\beta$  aus.

Es wurde die Fragestellung näher untersucht, ob die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1, als Interaktionspartner von Pol  $\beta$  (Bennett *et al.*, 1997) und zentrales Protein der BER, mit der 3'-5'-Exonukleaseaktivität (vgl. 4.2.2) als externer Korrekturleser für die Pol  $\beta$  agieren kann. Mit den rekombinanten Proteinen hPol  $\beta$ , hAPE1, hFEN1, T4-Ligase und dem doppelsträngigen DNA-Substrat mit einer Lücke von sechs Nukleotiden sind *in vitro* annähernd die Bedingungen einer "long-patch" BER rekonstituiert worden (Abb. 31).



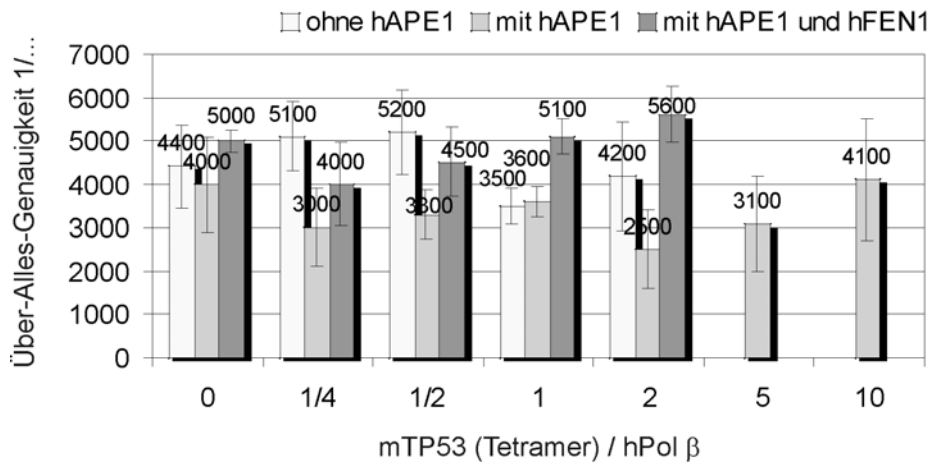
**Abb. 31 : Der Einfluss humaner APE1 auf die Genauigkeit humaner Pol  $\beta$ .**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\beta$  auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden 0, 1, 2; und 5 Moleküle hAPE1 pro Molekül Pol  $\beta$  eingesetzt. Die Reaktionen enthielten 10 Moleküle Pol  $\beta$  und ein Molekül hFEN1 pro Molekül DNA. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Es wurden steigende Mengen rekombinantes hAPE1 (Novus, Littleton) eingesetzt. Aus Abb. 31 geht hervor, dass die Über-Alles-Genauigkeit der hPol  $\beta$  von der 3'-5'-Exonukleasefunktion des hAPE1 unbeeinflusst war.

Die 3'-5'-Exonukleasefunktionen von TP53 und hAPE1 allein führten zu keiner Veränderung der Replikationsgenauigkeit der Pol  $\beta$ . In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob beide Proteine zusammen, möglicherweise auf Grund ihrer, *in vitro* beschriebenen, Protein-Protein Interaktion (Jayaraman *et al.*, 1997), einen Einfluss auf die Genauigkeit ausüben können. Dazu wurde die Replikationsgenauigkeit der Pol  $\beta$  in

Anwesenheit von hAPE1 und steigenden Mengen mTP53 untersucht (Abb. 32). Dieses Experiment wurde zusätzlich durch die Gegenwart von hFEN1 variiert.



**Abb. 32 : Der Einfluss von murinem TP53 auf die Genauigkeit humaner Pol β in Ab- und Anwesenheit von humaner APE1**

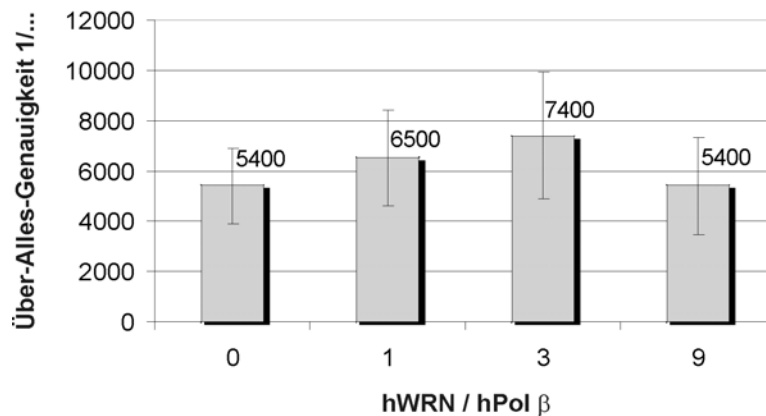
Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol β auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden 0, 1/4, 1/2, 1, 2; 5 und 10 Moleküle rekombinantes, murines TP53 (His-tag) Tetramer pro Molekül Pol β und pro Molekül DNA-Substrat eingesetzt. Das hAPE1 und hFEN1 wurden im stöchiometrischen Verhältnis von einem Molekül Enzym pro Molekül Pol β bzw. dsDNA eingesetzt. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Auch in diesen Versuchen (Abb. 32) war die Replikationsgenauigkeit der hPol β von den Exonukleasen APE1 und TP53 unbeeinflusst. Bezogen auf die Exonukleaseaktivität trat kein synergistischer Effekt zwischen dem APE1 und dem TP53 auf, der in einem Korrekturlesen mündete.

#### 4.9.3 Die Genauigkeit von hPol β nach der Titration mit WRN

Weder mit TP53, noch mit APE1 oder beiden Enzymen gemeinsam war eine Veränderung der Replikationsgenauigkeit von hPol β zu beobachten. Aus diesem Grund wurde noch eine weitere humane 3'-5'-Exonuklease, das Werner Protein (vgl. 4.2.3), getestet. Die WRN-Exonuklease kann wie *E. coli* Exo III 3'-phosphorylierte Nukleotide von 3'-rezessiver dsDNA entfernen, was auf eine Beteiligung an DNA-Reparaturereignissen hinweist (Shen & Loeb, 2000). Weitere Hinweise auf eine Rolle von WRN in der BER liefert die physikalische und funktionelle Interaktion von WRN mit hFEN1 (Brosh *et al.*, 2001). WRN stimuliert die Schnittaktivität von FEN1 auf kurzen 5'-"flap"-Substraten (Brosh *et al.*, 2001) und langen 5'-"flap"-Substraten sowie Pseudo-Y-Strukturen (Brosh *et al.*, 2002).

In Anwesenheit des hWRN und des hFEN1 wurde die Replikationsgenauigkeit der hPol  $\beta$  auf partiell doppelsträngiger DNA untersucht (Abb. 33).



**Abb. 33 : Der Einfluss von hWRN auf die Genauigkeit humaner Pol  $\beta$  in Anwesenheit von hFEN1**

Die Über-Alles-Genauigkeit von rekombinanter, humaner Pol  $\beta$  auf partiell doppelsträngiger DNA mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons. In den Reaktionen wurden 0, 1, 3 und 9 Moleküle rekombinantes, humanes WRN (Monomer) pro Molekül Pol  $\beta$  und pro Molekül DNA-Substrat eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in Anwesenheit von humanem FEN1 im stöchiometrischen Verhältnis von einem Molekül FEN1 pro Molekül dsDNA bzw. hPol  $\beta$ . Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Es war ein minimaler, aber nicht signifikanter, Anstieg der Genauigkeit in der Gegenwart von WRN zu beobachten (Abb. 33).

#### 4.9.4 Die Replikationsgenauigkeit von hPol $\beta$ unter "nucleotide pool bias"-Bedingungen in Anwesenheit von TP53

Es sollte der Anteil bestimmt werden, den einzelne Fehlpaarungen an der Über-Alles-Genauigkeit haben. Dazu wurden "nucleotide pool bias"-Bedingungen eingesetzt, d.h. die Konzentration eines Nukleotids wurde erhöht und die eines anderen erniedrigt. Am Beispiel der G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung befand sich die Konzentration des dGTPs in 10- bzw. 30-fachem Überschuss im Vergleich zur Konzentration des dATPs und induzierte so die Fehlpaarung. Die Häufigkeit einer Fehlpaarung wurde als Fehlerrate angegeben. Die Fehlerrate ergab sich aus der Steigung der Geraden aus Reversionsfrequenz (eines bestimmten Phagenphänotyps) / Fehlerausbeute aufgetragen gegen das Nukleotidverhältnis.

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die 3'-5'-Exonuklease des mTP53 (His-tag) unter "nucleotide pool bias"-Bedingungen auf die einzelnen Fehlerraten der Pol  $\beta$  hat.

Zuerst wurden die Fehlerraten von Pol  $\beta$  auf einzelsträngiger DNA und auf dem doppelsträngigen DNA-Substrat mit einer Lücke im Bereich des Amber-Codons bestimmt. Letzteres Substrat kam auch bei dem Experiment mit Pol  $\beta$  und mTP53 zum Einsatz. In Tab. 8 sind die Fehlerraten der einzelnen Fehlpaarungen aus diesen Experimenten zusammengefasst. Parallel dazu wurde unter äquimolaren dNTP-Konzentrationen die Über-Alles-Genauigkeit bestimmt (Tab. 8).

**Tab. 8 : Die Auswirkungen des “nucleotide pool bias“ auf die Genauigkeit der hPol  $\beta$**

Die Fehlerraten von hPol  $\beta$  wurden auf ssDNA und auf einer partiell doppelsträngigen DNA mit einer Lücke von sechs Nukleotiden im Bereich des Amber-Codons bestimmt. Ein Experiment wurde in Gegenwart von murinem TP53 (His-tag) durchgeführt. Das mTP53 wurde in einer Konzentration von einem Molekül Tetramer pro Molekül hPol  $\beta$  eingesetzt. Für jedes der Experimente wurde die Über-Alles-Genauigkeit separat bestimmt.

Die Fehlerrate errechnet sich aus den Steigungen der Geraden, die aus der Auftragung der um die Fehlerausbeute korrigierten Reversionsfrequenz eines bestimmten Phagenphänotyps gegen das Nukleotidverhältnis (10:1 und 30:1) resultiert. \* Es wurden nur die Werte aus den 10:1 “nucleotide pool bias“ berücksichtigt.

pool bias	induzierte Fehlpaarung	Phänotyp	Pol $\beta$ auf ssDNA	Pol $\beta$ auf dsDNA mit Lücke	Pol $\beta$ , mTP53 auf dsDNA mit Lücke
			Fehlerrate	Fehlerrate	Fehlerrate
G $\uparrow$ A $\downarrow$	G:T <sub>Matrize</sub>	<i>y/wt</i>	1/10000	1/13500	1/15600
C $\uparrow$ A $\downarrow$	C:T <sub>Matrize</sub>	<i>wt</i>	1/66700	1/43500	1/71400
T $\uparrow$ A $\downarrow$	T:T <sub>Matrize</sub>	<i>ts43</i>	1/250000	1/125000	1/100000
G $\uparrow$ T $\downarrow$	G:A <sub>Matrize</sub>	<i>ts42</i>	1/13200	1/58800	1/66700
C $\uparrow$ T $\downarrow$	C:A <sub>Matrize</sub>	<i>ts34</i>	1/71400	1/28600	1/35700*
A $\uparrow$ C $\downarrow$	A:G <sub>Matrize</sub>	<i>ts38</i>	1/58800*	1/58800*	1/34500
G $\uparrow$ C $\downarrow$	G:G <sub>Matrize</sub>	<i>ts35</i>	1/76900*	1/34500	1/43500
<b>Summe der Fehlerraten</b>			<b>1/4200</b>	<b>1/4900</b>	<b>1/5500</b>
<b>Über-Alles-Genauigkeit</b>			<b>1/5800</b>	<b>1/5100</b>	<b>1/5500</b>

Die mit äquimolaren dNTP-Konzentrationen erhaltenen Über-Alles-Genauigkeiten der hPol  $\beta$  waren in den drei Experimenten sehr ähnlich (Tab. 8) und ergaben eine relativ gute Übereinstimmung mit den bei früheren Experimenten erzielten Werten (vgl. Abb. 28, Abb. 29). Die Summen der Fehlerraten stimmen mit den Über-Alles-Genauigkeiten relativ gut überein. In den drei verschiedenen Experimenten tritt die G:T<sub>Matrize</sub>-

Fehlpaarung am häufigsten auf, wohingegen die T:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung nur selten vorkommt. Auf dem doppelsträngigen DNA-Substrat liegen die Fehlerraten von hPol  $\beta$  und hPol  $\beta$  mit mTP53 für die einzelnen Fehlpaarungen in der gleichen Größenordnung und unterscheiden sich nicht signifikant. Die 3'-5'-Exonuklease des TP53 führte demnach nicht zur Entfernung spezifischer Fehlpaarungen.

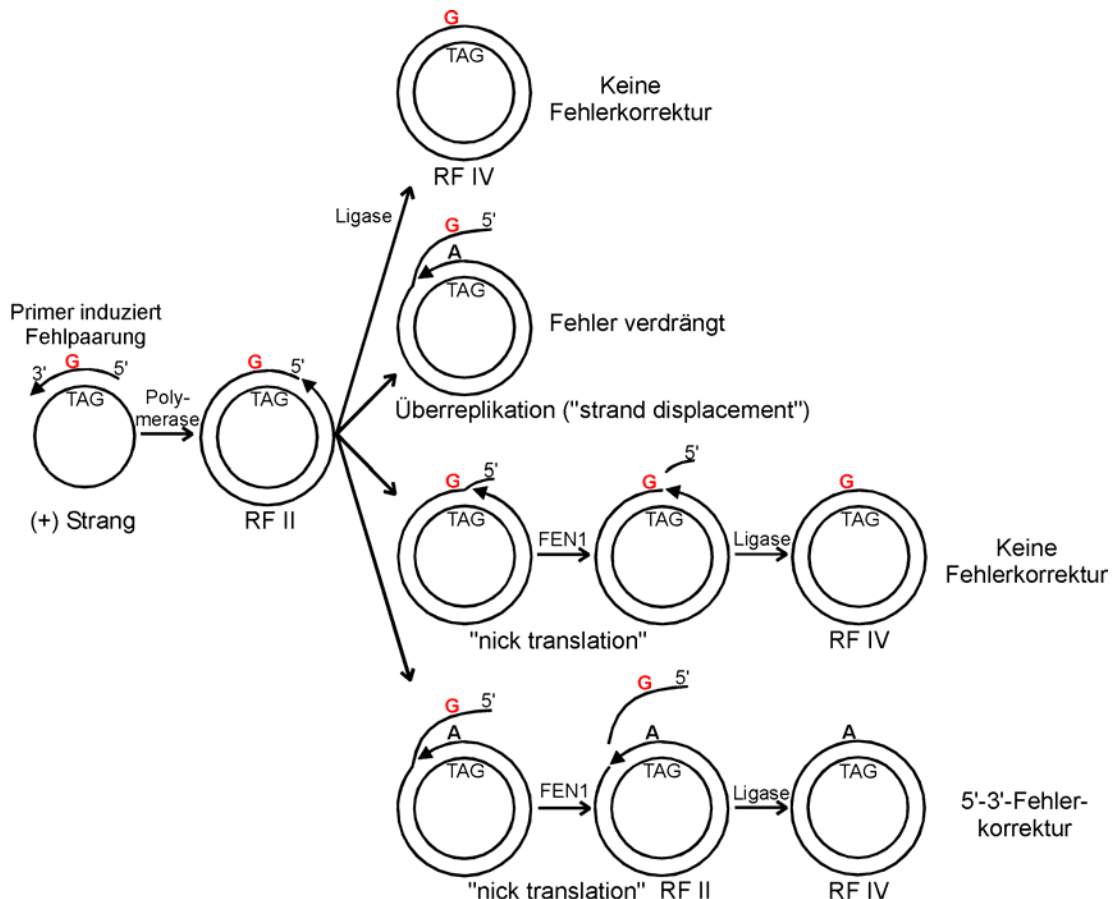
#### **4.10 Die Untersuchungen zur Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung**

Zum Anderen fokussierte sich diese Arbeit auf die Möglichkeit einer 5'-3'-Fehlerkorrektur für die von Pol  $\alpha$ -Prim bei der Initiation der Replikation verursachten Fehlpaarungen. Die Entfernung der von Pol  $\alpha$ -Prim gesetzten Primer im Verlauf der Okazaki-Fragment-Prozessierung, eröffnet einen Weg zur Fehlerbeseitigung (Murante *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2001) und nachfolgender Neusynthese der DNA mit der hochgenauen Pol  $\delta$ , die eine Korrektur lesende Exonukleaseaktivität besitzt.

Kürzlich beschrieben Maga *et al.* (2001b) ein *in vitro* Modell zur Okazaki-Fragment-Prozessierung, das auf einer gemeinsamen Aktion von bPol  $\delta$ , hPCNA, hRFC, hRPA und hFEN1 beruht. Pol  $\delta$  ist in Ab- und Anwesenheit von PCNA in der Lage, bei der DNA-Synthese auf einem minizirkulären Substrat aus 72 Nt ein auftretendes 5'-Ende eines RNA / DNA-Primers zu verdrängen. RPA bindet an den verdrängten Strang und begrenzt seine Länge auf ca. 30 Nt, so dass ein gutes Substrat für die Schnittaktivität der FEN1-Endonuklease entsteht. Auf diese Weise könnte der mit geringer Genauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierte RNA / DNA-Primer durch eine von der Pol  $\delta$  hochgenau replizierte DNA ersetzt werden, woraufhin der für Pol  $\alpha$ -Prim vermutete "Proofreader" überflüssig würde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Fehlpaarungen bei einer *in vitro* rekonstituierten Okazaki-Fragment-Prozessierung auch in Gegenwart von Ligase entfernt werden können. Als Substrat diente zirkuläre  $\Phi$ X174 $am16$ -ssDNA, die mit einer Länge von 5386 Nukleotiden im Gegensatz zu einem minizirkulären DNA-Substrat keine Torsionsspannungen aufweist, die möglicherweise zu einer vermehrten Ablösung der 5'-Enden der darauf hybridisierten Primer führen könnten. Auf die  $\Phi$ X174 $am16$ -ssDNA wurden Primer, die eine G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung im

Amber-Codon provozieren, hybridisiert. Die Fehlpaarungen waren 14 Nt, 9 Nt, 6 Nt und 3 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernt. Die Replikationen wurden mit zur Überreplikation (ÜR) befähigten Polymerasen in Gegenwart von hFEN1 und zusätzlich T4-Ligase ausgeführt. In Abb. 34 ist eine schematische Darstellung der *in vitro* Replikation und der dabei möglicherweise auftretenden DNA-Produkte wiedergegeben.



**Abb. 34 : Schema der *in vitro* Replikation zur Detektion der Fehlerkorrektur bei der Rekonstitution der Okazaki-Fragment-Processierung.**

Der Primer provoziert eine G:T<sub>Matrixe</sub>-Fehlpaarung, die durch das Zusammenwirken von Überreplikation, "flap"-Processierung und anschließender Ligation entfernt werden kann.

Die bei der rekonstituierten Okazaki-Fragment-Processierung verwendeten Enzyme können möglicherweise zu einer 5'-3'-Fehlerkorrektur führen (Abb. 34).

Die induzierten Fehler waren im  $\Phi$ X174<sub>am16</sub>-Reversionssystem detektierbar. Mit der replizierten  $\Phi$ X174<sub>am16</sub>-DNA wurden Sphäroplasten transfiziert und aus dem Verhältnis der Revertanten zur Gesamtzahl der Phagen wurde die Fehlerrate (FA) ermittelt (vgl. 3.12). Diese Experimente wurden mit zwei zur Überreplikation befähigten Polymerasen durchgeführt, der *E. coli* Klenow Pol und der humanen Pol  $\delta$ .

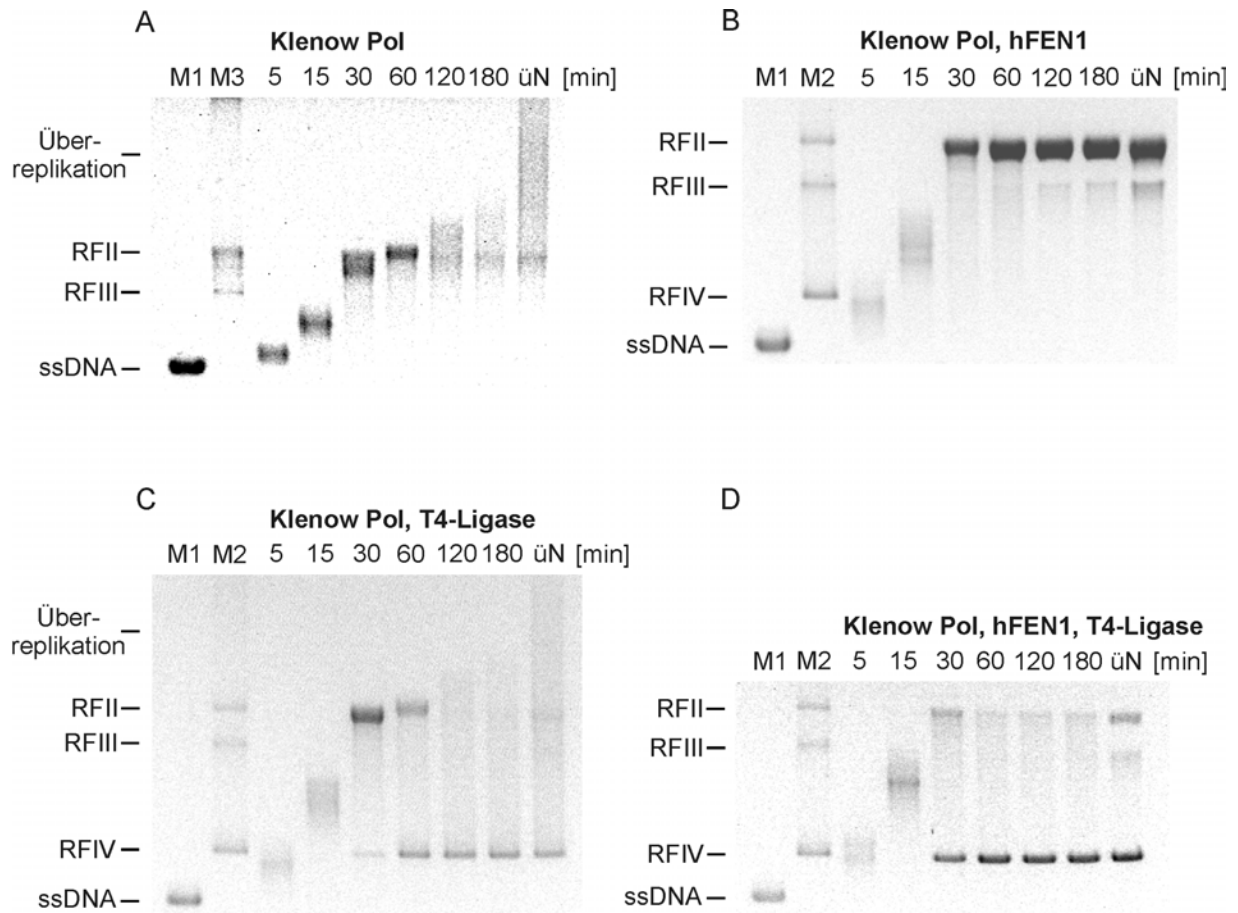


#### **4.10.1 Die *in vitro* Rekonstitution der Okazaki-Fragment-Prozessierung mit Klenow Polymerase**

Für Klenow Pol ist "strand displacement"-Synthese (Überreplikation) beschrieben worden, die durch das Einzelstrang-DNA bindende Protein (*E. coli* SSB) stimuliert wird (Canceill *et al.*, 1999). Es wurde untersucht, ob diese Eigenschaft ausreichend für die Entfernung einer vorgegebenen Fehlpaarung ist. Außerdem sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die Anwesenheit von hFEN1 und / oder T4-Ligase haben könnten. Die Gegenwart von hFEN1 könnte möglicherweise die 5'-3'-Exonukleaseaktivität komplementieren, die der Klenow Pol im Vergleich zur Pol I fehlt. Diese Vermutung liegt nahe, da FEN1 der Säugetiere homolog zur 5'-3'-Exonukleasedomäne der *E coli* Pol I ist (Robins *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 2002). Die 5'-3'-Exonuklease der Pol I spielt eine Rolle in der Exzisionsreparatur bei der "nick translation" und der Überreplikation. Außerdem entfernt sie RNA-Primer vom 5'-Ende bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung (Kornberg & Baker, 1992).

##### **4.10.1.1 Die *in vitro* Replikation mit Klenow Pol**

Der Verlauf der *in vitro* Replikationen (vgl. Abb. 34) mit Klenow Pol auf  $\Phi$ X174am16-ssDNA / Primer-Substraten mit G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarungen im Abstand von 14, 6 und 3 Nt vom 5'-Ende des Primers wurden auf Agarosegelen analysiert und dokumentiert. Stellvertretend sind in Abb. 35 die Reaktionen mit Primer 6 gezeigt, der eine Fehlpaarung im Abstand von 6 Nt vom 5'-Ende des Primers induziert.



**Abb. 35 : Die Replikation von  $\Phi$ X174am16-ssDNA mit Klenow Polymerase in Ab- und Anwesenheit von hFEN1 und T4-Ligase**

Die Replikationsreaktionen von  $\Phi$ X174am16-ssDNA mit Klenow Pol. Die von Primer 6 provozierte G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung an Position 5276 im Amber-Codon war 6 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernt. Teilproben der Reaktionen wurden nach 5, 15, 30, 60, 120, 180 min und 12 h (üN) abgestoppt und analysiert. **(A)** Klenow Pol. **(B)** Klenow Pol und hFEN1. **(C)** Klenow Pol, T4-Ligase. **(D)** Klenow Pol, T4-Ligase und hFEN1. Es wurden  $1,2 \times 10^{-12}$  mol ssDNA, 1,25 U (62,5 ng) Klenow Pol, 50 ng hFEN1 und 400 U T4-Ligase in 100  $\mu$ l Reaktionsvolumen eingesetzt. Das Verhältnis von ssDNA zu hFEN1 betrug 1:1.

M1: Marker,  $\Phi$ X174am16-ssDNA. M2: Marker, replikative Formen RFII (doppelsträngig, zirkulär mit Einzelstrangbruch), RFIII (doppelsträngig, linear), RFIV (doppelsträngig, geschlossen zirkulär) von  $\Phi$ X174am16. M3: Marker, RFII, RFIII von  $\Phi$ X174am16. Die Produktanalyse erfolgte auf einem 1-%igen Agarosegel mit 0,2  $\mu$ g/ml EthBr in Gel und Laufpuffer.

In Abb. 35A ist die Reaktion mit Klenow Pol dargestellt. Nach 30-60 min war die ssDNA vollständig in die RFII (zirkuläre dsDNA mit "nick") überführt und im weiteren Verlauf der Reaktion war eine einsetzende Überreplikation (ÜR) zu beobachten. Ein Teil der DNA blieb aber als RFII erhalten. In der Reaktion mit Klenow Pol und hFEN1 (Abb. 35B) war die ssDNA ebenfalls nach 30-60 min vollständig in RFII überführt. Eine ÜR-Reaktion war auf dem Gel nicht nachweisbar, da hFEN1 mit seiner 5'-3'-Endonukleaseaktivität den, bei der ÜR entstandenen, verdrängten Einzelstrang ("flap")

entfernte, d.h. Klenow Pol und hFEN1 führten eine effektive “nick translation“ aus. Die Gegenwart von T4-Ligase (Abb. 35C) erlaubte nach 30-60 min die teilweise Ligation der RFII (offen zirkulär) zur RFIV (geschlossen zirkulär). Ein Teil der RFII-DNA wurde anschließend überrepliziert. In Anwesenheit von T4-Ligase und hFEN1 (Abb. 35D) war die ssDNA nach 30 min vollständig in RFII und RFIV überführt. In Anwesenheit von hFEN1 wurde die durch ÜR entstandene “flap“-DNA geschnitten, so dass eine RFII-Bande detektierbar blieb.

#### 4.10.1.2 Die Fehlerausbeuten mit Klenow Pol

In einer Tabelle sind die ermittelten Fehlerausbeuten (Revertanten / Gesamtzahl Plaques; vgl. 3.12) für die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung aus den verschiedenen Reaktionen zusammengefasst. Um vergleichende Betrachtungen der erhaltenen Fehlerausbeuten aus den verschiedenen Reaktionen zu erleichtern, sind im unteren Bereich der Tabelle die Faktoren I-II aufgeführt, die das Ausmaß einer auftretenden Fehlerabnahme angeben.

Veränderungen der Fehlerausbeute (FA), die abhängig vom zeitlichen Verlauf einer Reaktion auftraten, wurden durch die Bildung des Quotienten aus FA nach ½ h / FA nach üN, im folgenden Faktor I genannt, verdeutlicht. Ein Wert von 1 für den Faktor I repräsentiert eine unveränderte Fehlerausbeute im Reaktionsverlauf, während Werte höher als 1 eine Abnahme der Fehlerausbeute widerspiegeln. Um auch die Auswirkungen des hFEN1 auf die Fehlerausbeute zu analysieren, wurden die Reaktionen ohne hFEN1 mit den hFEN1-haltigen Reaktionen verglichen. Dazu wurde der Quotient aus FA ohne hFEN1 nach ½ h / FA mit hFEN1 nach ½ h (Faktor II) gebildet. Auch hier gilt, dass ein Faktor mit dem Wert 1 eine unveränderte Fehlerausbeute wiedergibt, während Werte höher als 1 eine Abnahme der Fehlerhäufigkeit repräsentieren.

In Tab. 9 (A-D) sind die Fehlerausbeuten für die induzierten G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarungen aus den verschiedenen Reaktionen mit Klenow Pol zusammengefasst, wobei z.B. die in Tab. 9A (6 Nt) transfizierte DNA mit dem Agarosegel in Abb. 35A korrespondiert.

**Tab. 9 : Die Fehlerausbeuten mit Klenow Pol**

Die Fehlerausbeuten (FA; Revertanten / Gesamtzahl Phagen) wurde für die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung im Abstand von 14, 6 und 3 Nt vom 5'-Ende des Primers bestimmt. Die Form und die Reaktionsdauer der im Transfektionsexperiment verwendeten DNA sind angegeben. Faktor I gibt den Quotienten aus der FA ½ h / FA üN an. Faktor II ist der Quotient aus der FA ohne hFEN / FA mit hFEN1 bei einer Reaktionsdauer von ½ h. (A) Klenow Pol. (B) Klenow Pol, hFEN1. (C) Klenow Pol, T4-Ligase. (D) Klenow Pol, hFEN1, T4-Ligase.

A <b>Klenow Pol</b>		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers		
		14 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)		
RF II	½	0,48	0,14	0,14
RF II, z.T. ÜR	1	0,29	0,05	0,02
ÜR, RF II	üN	0,07	0,02	0,02
FA ½ h / FA üN	Faktor I	7	7	7

B <b>Klenow Pol, hFEN1</b>		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers		
		14 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)		
RF II	½	0,45	0,15	0,03
RF II	1	0,25	0,04	0,002
RF II	üN	< 0,01	0,0004	0,0001
FA ½ h / FA üN	Faktor I	> 45	375	300
FA ½ h A / FA ½ h B	Faktor II	1,1	0,9	4,7

C <b>Klenow Pol, T4-Ligase</b>		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers		
		14 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)		
RF II, RF IV	½	0,39	0,22	0,25
RF IV, RF II, ÜR	1	0,35	0,20	0,26
RF IV, ÜR	üN	0,26	0,21	0,31
FA ½ h / FA üN	Faktor I	1,5	1	0,8

D <b>Klenow Pol, T4-Ligase, hFEN1</b>		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers		
		14 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)		
RF IV, RF II	½	0,45	0,19	0,045
RF IV, RF II	1	0,67	0,16	0,065
RF IV, RF II	üN	0,54	0,19	0,057
FA ½ h / FA üN:	Faktor I	0,8	1	0,8
FA ½ h C / FA ½ h D	Faktor II	0,9	1,2	5,6

Die mit Klenow Pol erhaltenen Werte erlaubten eine zeitabhängige Analyse der Fehlerausbeuten, die mit vollständig aufgefüllter DNA (RFII) und mit davon abgeleiteten DNA-Formen erzielt wurden.

In den Reaktionen mit Klenow Pol allein verringerten sich mit einsetzender ÜR die Fehlerausbeuten um das siebenfache (Faktor I, Tab. 9A). Dies war unabhängig vom Abstand des Fehlers vom 5'-Ende des Primers. Die Fähigkeit zur ÜR war also ausreichend für die Verdrängung einer vorgegebenen Fehlpaarung.

In Anwesenheit von hFEN1 reduzierten sich die Fehlerausbeuten zeitabhängig im Verlauf der Experimente dramatisch (>45-375-fach, Faktor I, Tab. 9B). Diese im Vergleich zur Klenow Pol allein signifikant erniedrigten Fehlerausbeuten ließen auf eine Stimulation der Initiation der ÜR von Klenow Pol durch hFEN1 schließen. Klenow Pol und hFEN1 interagierten funktionell in einer effektiven "nick translation".

Bei den Replikationsreaktionen von Klenow Pol in Anwesenheit von T4-Ligase veränderten sich die Fehlerausbeuten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit nicht oder nur geringfügig (1,5-fach, Faktor I, Tab. 9C). Die vollständig replizierte DNA (RFII) wurde von der T4-Ligase in die geschlossene RFIV überführt und somit wurde eine ÜR weitgehend unterbunden.

Bei den Reaktionen in Anwesenheit von T4-Ligase und hFEN1 verhinderte ebenfalls die Ligation der aufgefüllten DNA das Einsetzen einer "nick translation" und damit eine zeitabhängige Reduktion der Fehlerausbeuten (Faktor I, Tab. 9D).

Zusätzlich zu dem bisher analysierten zeitabhängigen Einfluss der Enzyme auf die Fehlerausbeute, wurde auch eine vergleichende Betrachtung in Abhängigkeit von der Position der vorgegebenen Fehlpaarung angestrebt. Nach abgeschlossener Auffüllreaktion der DNA (RFII, nach halbstündiger Reaktionszeit) waren für die Fehlpaarungen an Position 6 (für alle Reaktionen) und an Position 3 (für die Reaktionen ohne hFEN1) etwa zwei- bis dreifach niedrigere Fehlerausbeuten als an Position 14 messbar. Da diese Beobachtung auf alle Experimente (Tab. 9A-D) zutraf, handelte es sich um ein Phänomen, das abhängig von der Position der G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung im Primer war. Vermutlich führte eine nahe am 5'-Ende des Primers befindliche G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung zu einer Destabilisierung der DNA-Duplex, so dass ein Ablösen des Primerendes einschließlich der Fehlpaarung gefördert wurde. Dies führte möglicherweise schon *in vitro* zu einer DNA-Synthese bis einschließlich zur Fehlpaarung. Auch ist denkbar, dass in der transfizierten *E. coli* Zelle die destabilisierten 5'-Enden einen Angriffspunkt für zelleigene 5'-Nukleasen bildeten.

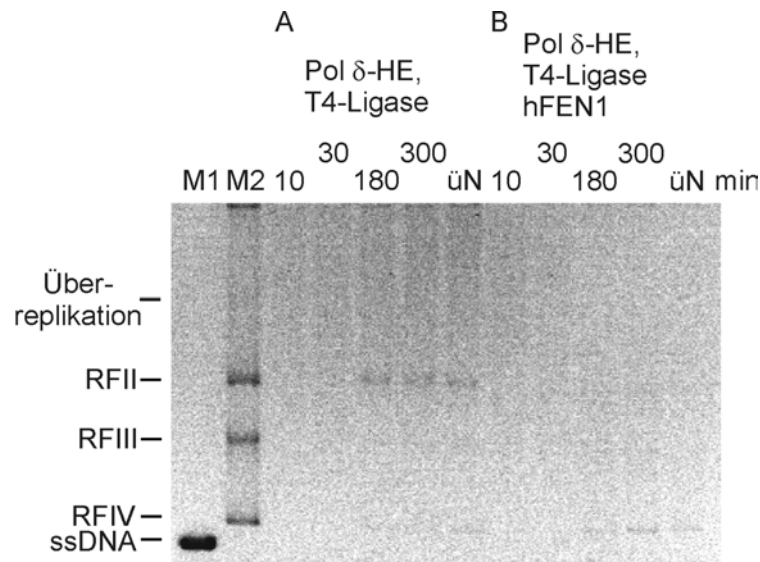
Für die Fehlpaarung an Position 3 ist allerdings ein Einfluss von hFEN1 auf die Fehlerausbeute hervorzuheben. Ein Vergleich der hFEN1-haltigen Reaktion mit der dazugehörigen hFEN1-freien Reaktion ergab für die Reaktion ohne T4-Ligase eine 4,7-fache (Faktor II, Tab. 9B) und für die Reaktionen mit T4-Ligase eine 5,6-fache (Faktor II, Tab. 9D) Erniedrigung der Fehlerausbeute in Anwesenheit von hFEN1. Es ist noch anzumerken, dass die Fehlerausbeute in Abwesenheit von T4-Ligase, bedingt durch eine fortwährend ablaufende "nick translation", weiter absank. In Anwesenheit von T4-Ligase wurde der Einzelstrangbruch hingegen geschlossen.

#### **4.10.2 Die *in vitro* Rekonstitution der eukaryotischen Okazaki-Fragment-Processing mit Pol $\delta$ -Holoenzym**

Für Pol  $\delta$ -Holoenzym (Pol  $\delta$ , RFC, PCNA) aus Kalbsthymus ist eine begrenzte Überreplikationsaktivität auf einer M13-DNA Matrize mit Lücke beschrieben worden (Podust *et al.*, 1995). Kürzlich konnte beobachtet werden, dass es sich dabei um eine intrinsische Fähigkeit von bPol  $\delta$  handelt, da diese auch in Abwesenheit von auxiliären Faktoren auftrat (Maga *et al.*, 2001b). Für Pol  $\delta$  aus *S. cerevisiae* wurde hingegen eine Abhängigkeit der Überreplikation von den Faktoren RFC und PCNA nachgewiesen (Ayyagari *et al.*, 2003).

##### **4.10.2.1 Die *in vitro* Replikation mit Pol $\delta$ -Holoenzym**

Die *in vitro* Replikationen der ssDNA mit hPol  $\delta$ -Holoenzym in Anwesenheit von hRPA und T4-Ligase wurden auf Agarosegelen analysiert. Die vorgegebenen Fehler waren 14, 9, 6 und 3 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernt. In Abb. 36 sind die Reaktionen mit Primer 7, der die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung im Abstand von 3 Nt vom 5'-Ende induziert, dargestellt worden.



**Abb. 36 : Die Replikation von  $\Phi$ X174*am*16-ssDNA mit hPol  $\delta$ -Holoenzym in Ab- und Anwesenheit von hFEN1**

Die Replikationen von  $\Phi$ X174*am*16-ssDNA mit hPol  $\delta$ -Holoenzym (hPol  $\delta$ , hRFC, hPCNA) in Anwesenheit von hRPA. Die von Primer 7 provozierte G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung an Position 5276 im Amber-Codon war 3 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernt. Teilproben der Reaktionen wurden nach 10, 30, 180, 300 min und üN abgestoppt und analysiert.

(A) hPol  $\delta$ -HE und T4-Ligase (B) hPol  $\delta$ -HE, T4-Ligase und hFEN1. Es wurden  $4,7 \times 10^{-13}$  mol ssDNA, 60 ng hPol  $\delta$ , 30 ng RFC, 120 ng PCNA, 1,8  $\mu$ g RPA, 20 ng hFEN1 und 100 U T4-Ligase in 40  $\mu$ l Reaktionsvolumen eingesetzt. Das Verhältnis von ssDNA zu hFEN1 betrug 1:1 und von ssDNA zu Pol  $\delta$  1:½. M1: Marker  $\Phi$ X174*am*16-ssDNA; M2: Marker, replikative Formen RFII, RFIII, RFIV von  $\Phi$ X174*am*16. Die Produktanalyse erfolgte auf einem 1-%igen Agarosegel mit 0,2  $\mu$ g/ml EthBr in Gel und Laufpuffer.

Für hPol  $\delta$ -HE war in Anwesenheit von hRPA und T4-Ligase eine schwache Bande der geschlossenen zirkulären RFIV detektierbar (Abb. 36A). Dabei handelte es sich um den Anteil der DNA-Moleküle auf denen hPol  $\delta$ -HE keine oder eine auf den Agarosegelen nicht detektierbare "strand displacement"-Synthese durchführte. Der größere Anteil der DNA lag als RFII und überreplizierte Form vor und deutete damit auf eine geringe Effektivität der Ligationsreaktion mit der T4-Ligase hin. Im Gegensatz dazu war in Anwesenheit von hFEN1 und T4-Ligase eine höhere Ligationsrate der DNA zu beobachten (Abb. 36B). Hier trat nur noch eine sehr schwache ÜR auf und RFII war kaum zu detektieren.

#### 4.10.2.2 Die Fehlerausbeute mit Pol $\delta$ -Holoenzym

Die mit hPol  $\delta$ -Holoenzym in Anwesenheit von hRPA für die vorgegebene G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung erhaltenen Fehlerausbeuten sind in Tab. 10 angegeben.

**Tab. 10: Die Fehlerausbeuten mit hPol  $\delta$ -Holoenzym**

Die Fehlerausbeuten (FA; Revertanten / Gesamtzahl Phagen) wurden für die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung im Abstand von 14, 9, 6 und 3 Nt vom 5'-Ende des Primers bestimmt. Die Form und die Reaktionsdauer der im Transfektionsexperiment verwendeten DNA sind angegeben. Faktor I gibt den Quotienten aus der FA 1/6 h / FA 3 h an. Faktor II ist der Quotient aus der FA ohne hFEN / FA mit hFEN1 bei einer Reaktionsdauer von 1/6 h. **(A)** hPol  $\delta$ -Holoenzym, T4-Ligase. **(B)** hPol  $\delta$ -Holoenzym, hFEN1, T4-Ligase.

<b>A</b>		hPol $\delta$ Holoenzym, T4-Ligase		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers			
				14 Nt	9 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)					
ÜR	1/6	0,05	0,05	0,01	0,007		
RF II, ÜR	1/2	0,09	0,05	0,02	0,008		
RF II, III, IV, ÜR	3	0,11	0,1	0,03	0,007		
FA 1/6 h / FA 3 h	Faktor I	0,45	0,5	0,3	1		

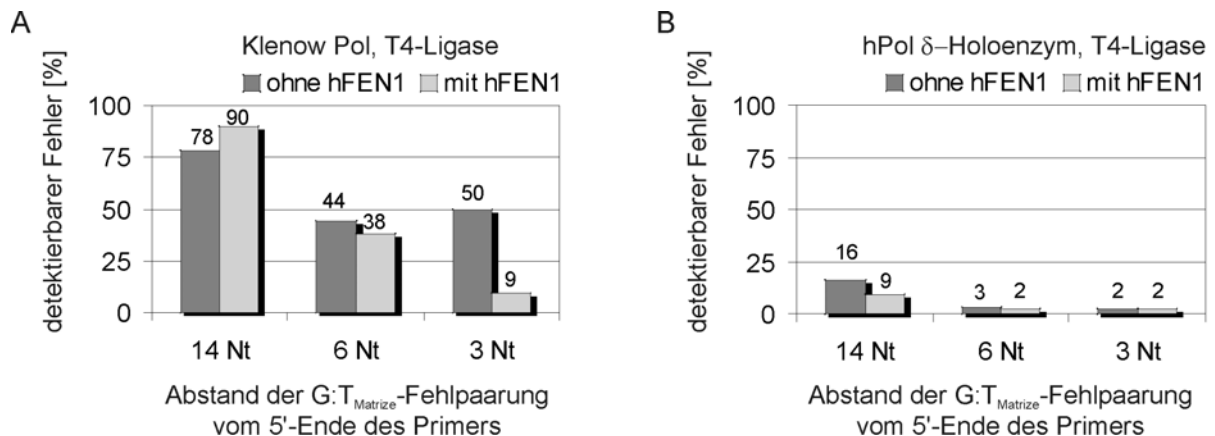
<b>B</b>		hPol $\delta$ Holoenzym, T4-Ligase hFEN1		Abstand der G:T <sub>Matrize</sub> -Fehlpaarung vom 5'-Ende des Primers			
				14 Nt	9 Nt	6 Nt	3 Nt
DNA	Zeit [h]	Fehlerausbeute (FA)					
anrepliziert, ÜR	1/6	0,03	0,04	0,007	0,007		
RF	1/2	0,05	0,03	0,01	0,004		
RF II, III, IV, (ÜR)	3	0,05	0,04	0,01	0,003		
FA 1/6 h / FA 3 h	Faktor I	0,6	1	0,7	2,3		
FA 1/6 h A / FA 1/6 h B	Faktor II	1,6	1,3	1,4	1		

Für Pol  $\delta$ -HE waren, unabhängig vom Abstand des Fehlers vom 5'-Ende, in Anwesenheit von T4-Ligase nur sehr geringe Fehlerausbeuten nachweisbar (Tab. 10A). Die Entfernung der Fehler war auf eine ausgeprägte ÜR zurückzuführen. Außerdem legte die niedrige Fehlerrate die Vermutung nahe, dass auch die auf den Agarosegelen als RFII detektierte DNA zumindest einen kurzen durch ÜR entstandenen "flap" aufwies. Dieser war ausreichend für eine Verdrängung des Fehlers, führte aber auf einem 1%-Agarosegel zu keinem veränderten Laufverhalten der DNA. In Anwesenheit von hFEN1 und T4-Ligase wurden ähnlich niedrige Fehlerausbeuten beobachtet (Tab. 10B). Dies ließ darauf schließen, dass auch die RFIV erst nach ÜR durch hPol  $\delta$ -HE und Prozessierung durch hFEN und anschließende Verknüpfung durch T4-Ligase entstanden war. hPol  $\delta$ -HE und hFEN1 waren zu sehr effektiver "nick translation" fähig,



die Fehler nachweislich bis zu einer Distanz von 14 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernte, bevor in Gegenwart von T4-Ligase der "nick" geschlossen werden konnte.

Um einen direkten Vergleich des Ausmaßes einer 5'-3'-Fehlerkorrektur in Anwesenheit von T4-Ligase zwischen den zwei untersuchten Polymerasen zu ermöglichen, wurden in Abb. 37 die Fehlerausbeuten in [%] angegeben. Als Bezugsgröße für die ermittelten Werte diente die detektierbare maximale phänotypische Ausprägung einer mit Korrekturprimer 1 induzierten G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung (an Position 14) in Experimenten mit der jeweiligen Polymerase in Anwesenheit von T4-Ligase. Die Reaktionsbedingungen und -zeiten waren so gewählt, dass eine Überreplikation weitgehend vermieden wurde. Die Mittelwerte der so in jeweils 5-6 Experimenten ermittelten Fehlerausbeuten betragen für Klenow Pol FA=0,5 (±0,08) und hPol δ-HE FA=0,32 (±0,06) und stellen somit die in diesem System maximal detektierbare Anzahl der Fehler dar. Diese maximal detektierbare Zahl der Fehler wurde gleich 100 % gesetzt. Die Zahlen der tatsächlich detektierten Fehler aus den Experimenten zur 5'-Fehlerkorrektur (Tab. 9, Tab. 10) wurden entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt und in [%] angegeben (Abb. 37).



### Abb. 37 : Der Ausbau der G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung

Der Ausbau der G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung ausgehend vom 5'-Ende des Primers wurde für (A) Klenow Pol und (B) hPol δ-HE in Anwesenheit von T4-Ligase und mit und ohne hFEN1 grafisch dargestellt. Die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung war 14, 6 oder 3 Nt vom 5'-Ende des Primers entfernt. Die maximal messbare phänotypische Ausprägung einer Fehlpaarung ist gleich 100 % gesetzt worden. Die tatsächlich detektierbaren Fehler sind entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt worden und in [%] angegeben. Die Reaktionen waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung abgeschlossen, für Klenow Pol nach ½ h und für hPol δ-HE nach 1/6 h.

Die schematische Darstellung der detektierbaren Fehler in Anwesenheit von T4-Ligase ermöglichte den direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Polymerasen (Abb.

37). Hierbei wurde deutlich, dass mit Klenow Pol in Anwesenheit von T4-Ligase weder "strand displacement"-Synthese noch "nick translation" effektiv stattgefunden haben, so dass noch 38-90 % der vorgegebenen Fehler detektierbar waren (Abb. 37A). Lediglich für Fehlpaarungen an Position 3 war mit hFEN1 eine Abnahme des Fehler auf 9 % feststellbar. Wohingegen mit hPol  $\delta$ -HE an Position 14 nur noch 16 % (ohne hFEN1) und 9 % (mit hFEN1) der vorgegebenen Fehler detektierbar waren (Abb. 37B). Bei den näher am 5'-Ende befindlichen Fehlern waren es sogar nur 2-3 %. Eine effektive Überreplikation bzw. "nick translation" der DNA in Anwesenheit von T4-Ligase verursachte eine signifikant erniedrigte Fehlerhäufigkeit.

## 5. Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen funktionelle Analysen von Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität bei der eukaryotischen DNA-Replikation, Reparatur und Okazaki-Fragment-Prozessierung dienen. Zum einen wurde auf die Möglichkeit eines intermolekularen 3'-5'-Korrekturlesens für DNA-Polymerasen ohne intrinsischen "Proofreader" durch autonome 3'-5'-Exonukleasen fokussiert. Es wurden mit dem Tumorsuppressorprotein P53 (TP53), dem Werner Protein (WRN) und der Apurinischen / Apyrimidinischen Endonuklease 1 (APE1) autonome 3'-5'-Exonukleasen ausgewählt, die durch vielfältige Interaktionen mit DNA-Polymerasen und / oder akzessorischen Proteinen der Replikation und Reparatur Hinweise auf eine Beteiligung an diesen Vorgängen lieferten.

Zum anderen war ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Analyse eines möglichen 5'-3'-Korrekturlesens im Rahmen einer funktionellen Interaktion von humaner Polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) und humaner Flap-Endonuklease 1 (FEN1) in einer rekonstituierten Okazaki-Fragment-Prozessierung. Hiermit sollte die Fragestellung, wie viele Nukleotide eines Primers bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung entfernt werden können, näher betrachtet werden. Diese Experimente sollten Hinweise darauf liefern, ob das 5'-3'-Korrekturlesen ausreichen würde, die von der ungenauen Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim) bei der Primersynthese verursachten Fehler zu entfernen.

### 5.1 Das $\Phi$ X174*am*16-Reversionssystem

#### 5.1.1 Die Genauigkeitsmessungen mit verschiedenen Polymerasen

Vergleichend wurde eine Auswahl von Polymerasen mit und ohne intrinsische Korrekturfunktion im  $\Phi$ X174*am*16-Reversionssystem untersucht, um sicherzustellen, dass dies eine geeignete Methode zur Detektion von replikativen Fehlern bzw. "Proofreading" ist.

Die Polymerase des T4-Bakteriophagen repliziert DNA mit hoher Genauigkeit und besitzt eine starke 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die 200-fach aktiver als die Korrektorexonuklease der *E. coli* Pol I ist (Kornberg & Baker, 1992). Mit dem  $\Phi$ X174*am*16-Reversionssystem konnte die erwartete hochgenaue DNA-Synthese der T4-Pol bestätigt werden (Abb. 19). Für die T7-Pol sind eine Polymerase- und starke intrinsische 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Hori *et al.*, 1979; Nordstrom *et al.*, 1981; Engler *et al.*, 1983) beschrieben worden, wohingegen das gentechnisch hergestellte Derivat

der T7-Pol, die Sequenase Version 2.0, exonukleasefrei ist (Tabor & Richardson, 1989). Wie erwartet replizierte die T7-Pol mit Korrektorexonuklease die DNA mit höherer Genauigkeit als die Exonuklease-defiziente Sequenase Version 2.0 (Abb. 19). Diese Tendenz wurde auch von Kunkel *et al.* (1994) für Wildtyp-T7-Pol und eine Exonuklease-defiziente T7-Pol beschrieben. Die Klenow Pol enthält als großes Fragment der *E. coli* Pol I eine Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Kornberg & Baker, 1992). Bei der Klenow  $exo^-$  Pol unterbindet eine Mutation in der Exonukleasedomäne die 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Derbyshire *et al.*, 1988). Im Vergleich zur Klenow Pol mit Korrektorexonuklease replizierte die Klenow  $exo^-$  Pol die DNA mit einer höheren Fehlerhäufigkeit (Abb. 19). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Bebenek *et al.* (1990) für Exonuklease-defiziente Mutanten im Vergleich zur Klenow Pol beschriebenen vermehrten Häufigkeit von Basensubstitutionen.

Die Reversen Transkriptasen, HIV-RT und AMV-RT, besitzen keine 3'-5'-Korrektorexonuklease. Die Über-Alles-Genauigkeit von in *E. coli* exprimierter rekombinanter HIV-RT, wurde mit 1/9700 bestimmt (Abb. 19). Diese Genauigkeit bestätigte die von Weber & Große (1989) im gleichen System erhaltenen Werte von 1/5000-1/7000. Auch für die AMV-RT wurde eine relativ hohe Ungenauigkeit von 1/5000 bestimmt (Abb. 19). Dieser Wert stimmte gut mit der von Preston *et al.* (1988) im  $\Phi X174am3$ -System bestimmten Genauigkeit der AMV-RT von 1/9000 überein.

Die für Exonuklease-defiziente Polymerasen und Reverse Transkriptasen erzielten Resultate stehen im Einklang mit der Aussage von Loeb & Kunkel (1982), dass eine Replikationsgenauigkeit von ca. 1/10000 charakteristisch für Polymerasen ist, denen eine "Proofreading"-Funktion fehlt. Die höhere Genauigkeit von Polymerasen mit Korrekturfunktion im Vergleich zu den Exonuklease-defizienten Polymerasen belegte, dass das  $\Phi X174am16$ -Reversionssystem zur Detektion von intramolekularem und intermolekularem "Proofreading", ausgeführt durch das gleiche Enzym (vgl. Abb. 1A, 1B), verwendbar war. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Wegen des Korrekturlesens kann das System jedoch nicht leisten.

### 5.1.2 Die Genauigkeitserhöhung durch intermolekulare Korrekturleser

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das  $\Phi X174am16$ -Reversionssystem auch zum Nachweis von intermolekularem Korrekturlesen durch eine autonome 3'-5'-Exonuklease geeignet ist (vgl. Abb. 1C), wie die 2-3-fache

Genauigkeitserhöhung von Pol  $\alpha$ -Prim durch *E. coli* Exo III belegt (Abb. 21). Bereits Perrino & Loeb (1989) wiesen mit der exonukleolytisch aktiven  $\epsilon$ -Untereinheit der *E. coli* Pol III eine Genauigkeitserhöhung für bPol  $\alpha$ -Prim nach.

Das Modell vom intermolekularem Korrekturlesen (vgl. Abb. 1C) legt die Interaktion von autonomen 3'-5'-Exonukleasen mit DNA-Polymerasen und / oder weiteren an Replikation und Reparatur beteiligten Proteinen nahe. Das Tumorsuppressorprotein P53, das Werner Protein und die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 erfüllen mit ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität und den vielfältigen Wechselwirkungen mit Polymerasen und / oder akzessorischen Proteinen der Replikation und Reparatur somit die Anforderungen, die an einen externen "Proofreader" gestellt werden (vgl. 1.5).

## 5.2 Die Replikationsgenauigkeit von Pol $\alpha$ -Prim

Pol  $\alpha$ -Prim ist essenziell für die Initiation der Replikation und initiiert die DNA-Synthese *de novo*. Sie ist nicht kovalent mit einer 3'-5'-Exonuklease assoziiert (Roberts & Kunkel, 1996), die zu einer Erhöhung der Genauigkeit beitragen könnte.

Die hier unter verschiedenen Bedingungen gemessene relativ niedrige Über-Alles-Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim von 1/8000-1/13400 (Abb. 20) steht im Einklang mit der von Grosse *et al.* (1983) im gleichen System bestimmten Replikationsgenauigkeit. Auch für Pol  $\alpha$ -Prim Präparationen verschiedener Herkunft wurden für Basensubstitutionen im Vorwärts-Mutationssystem auf M13-DNA Genauigkeiten in der gleichen Größenordnung ermittelt (Kunkel & Alexander 1986; Roberts & Kunkel, 1988; Kunkel *et al.*, 1989).

### 5.2.1 TP53 – ein Korrekturleser für Pol $\alpha$ -Prim?

Fehlpaarungen werden von Pol  $\alpha$ -Prim nur sehr ineffizient verlängert, was zu einer partiellen Blockierung der DNA-Replikation führt (Perrino & Loeb, 1989; Mendelman *et al.*, 1990; Reckmann *et al.*, 1983). Außerdem ist sie wenig prozessiv, d.h. sie dissoziiert bereits nach dem Einbau von 6-20 Nukleotiden von der Matrize (Grossberger & Clough, 1981; Mikhailov & Androsova, 1984; Hohn & Grosse, 1987). Diese beiden Eigenschaften begünstigen im naszierenden DNA-Strang ein von externen 3'-5'-Exonukleasen ausgeführtes "Proofreading" für Polymerase induzierte Fehler.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Replikationsgenauigkeit auf natürlicher ssDNA untersucht. Die Bedingungen waren so gewählt, dass sie die Fehlerhäufigkeit der

Polymerase nicht erhöhten. In den funktionellen Genauigkeitsstudien war kein Einfluss von TP53 auf die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim nachweisbar (Abb. 22, 25). Ebenso verhielt es sich auf dem mit einer Lücke versehenen dsDNA-Substrat (Abb. 24, 26). Im Gegensatz hierzu beobachtete Huang (1998) einen Ausbau von Fehlpaarungen durch TP53 auf kurzen Oligonukleotid-Substraten unter Bedingungen, welche die Bildung von Fehlpaarungen durch Pol  $\alpha$ -Prim provozierten. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch könnte folgende Überlegung sein: Möglicherweise wirkt sich die Anwesenheit von TP53 erst bei stark erhöhter Fehlerhäufigkeit der synthetisierenden Polymerase positiv auf die Genauigkeit aus. Es ist denkbar, dass erst eine gesteigerte Häufigkeit der Dissoziationsereignisse, bei denen sich die Polymerasemoleküle vom Substrat ablösen, der Exonuklease einen Angriffspunkt bietet.

Die Exonukleaseaktivität von TP53 wurde auch auf eine Funktion bei der Entfernung von in der Tumorbehandlung eingesetzten therapeutischen Nucleosidanaloga untersucht. Neue Forschungsergebnisse belegen, dass TP53 beim exonukleolytischen Ausbau von in der DNA befindlichen zytotoxischen Nucleosidanaloga nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. TP53 bindet an die geschädigte DNA und löst dann vermutlich Zellzyklusarrest oder Apoptose aus (Feng *et al.*, 2000; Achanta *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002).

Die vorgestellten Experimente wurden unter Bedingungen ausgeführt, welche die Fähigkeit der Polymerase, Fehler zu induzieren, nicht zusätzlich stimulierte. Unter diesen Bedingungen wäre möglicherweise eine physikalische Interaktion von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim in einem Komplex für eine funktionelle Zusammenarbeit beider Proteine während des Replikationsvorgangs erforderlich. Unter dieser Vorgabe wird die fehlende funktionelle Interaktion der beiden Proteine (Abb. 22, 24, 25) von dem Befund unterstützt, dass sich mit rekombinanten Proteinen als auch mit Proteinen aus Zellen und Geweben kein Protein-Protein-Komplex von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim mittels Dichtegradientenzentrifugation und affinitätschromatografischen Methoden nachweisen ließ (Hartmann, 2001). Im Gegensatz dazu reinigten Melle & Nasheuer (2002) einen Komplex aus TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim mittels eines immunaffinitätschromatografischen Verfahrens. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass dieser Komplex *in vitro* die Fähigkeit besaß, vorgegebene Fehlpaarungen zu entfernen und die neu gebildeten

3'-Enden, wenn auch ineffizient, zu verlängern. Die Autoren geben zu bedenken, dass dieser Vorgang wahrscheinlich zu langsam ist, um als "Proofreading" von Nutzen zu sein. Dornreiter (nicht publizierte Beobachtung) fand, dass *in vivo* ein spezifischer Komplex von TP53 und einer immunologischen Subklasse von Pol  $\alpha$ -Prim detektiert werden kann (Albrechtsen *et al.*, 1999). Es gibt auch Hinweise auf eine Funktion von TP53 bei der Initiation der Replikation. So zeigten Vaziri *et al.* (2003), dass TP53 während der S-Phase die mehrfache Initiation der Replikation an einem Replikationsursprung unterbindet. Die hier für TP53 vorgestellten Ergebnisse, sowie die teilweise widersprüchlichen Beobachtungen anderer Autoren deuten weniger auf eine Rolle von TP53 als Korrekturleser für Pol  $\alpha$ -Prim hin, sondern legen vielmehr eine andersartige, vielleicht regulatorische, Rolle von TP53 bei der DNA-Replikation nahe.

Für eine funktionelle Interaktion von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim ist möglicherweise die Anwesenheit weiterer Faktoren von Bedeutung. Vorstellbar ist, dass diese Faktoren die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von TP53 stimulieren. Die Assoziation von TP53 mit einem anderen Protein bedingt vielleicht eine Konformationsänderung im TP53, die auch die Exonukleaseaktivität beeinflusst. Für die WRN-3'-5'-Exonuklease ist beispielsweise eine Stimulation der Aktivität durch das DNA-Reparaturprotein Ku-Heterodimer beschrieben worden, mit dem es auch physikalisch interagiert (Orren *et al.*, 2001). Möglicherweise steigern akzessorische Proteine des Replikationskomplexes *in vivo* die Präferenz der 3'-5'-Korrektur exonukleasen für fehlgepaarte DNA. So ist beispielsweise für Pol  $\gamma$  in Gegenwart vom Einzelstrang-Bindeprotein eine erhöhte Präferenz für Fehlpaarungen nachgewiesen worden (Gray & Wong, 1992). Auch wäre ein zusätzlicher Faktor denkbar, der die Exonukleaseaktivität von TP53 mit der Pol  $\alpha$ -Prim verbindet und so deren Kooperation ermöglicht. Aus diesem Grund war es von Interesse, die Rolle des Einzelstrang-Bindeproteins RPA näher zu untersuchen, da es sowohl mit TP53 (Dutta *et al.*, 1993; He *et al.*, 1993; Li & Botchan, 1993) als auch mit Pol  $\alpha$ -Prim (Dornreiter *et al.*, 1992; Nasheuer *et al.*, 1992) interagiert.

Das zusätzlich zum TP53 vorhandene RPA übte in den durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Pol  $\alpha$ -Prim aus (Abb. 23, 25). Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass für RPA keine Hinweise auf einen spezifischen Einfluss auf die TP53-Exonukleaseaktivität gefunden wurden (Hartmann, 2001). Bei den hier auf langen ssDNA-Matrizen durchgeführten Genauigkeitsstudien

konnte sich anscheinend keine physikalische Interaktion zwischen RPA und TP53 ausbilden, da die Komplexbildung von RPA-TP53 durch ssDNA unterbunden wird (Miller *et al.*, 1997). An ssDNA gebundenes RPA tritt nicht mit TP53 in Wechselwirkung. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die p70-Untereinheit von RPA für die Wechselwirkungen mit TP53 und ssDNA verantwortlich ist und eine Präferenz für ssDNA besitzt (Miller *et al.*, 1997). Auch eine von DNA-Schäden induzierte Hyperphosphorylierung von RPA verhindert eine Komplexbildung mit TP53 (Abramova *et al.*, 1997). In einer *in vitro* Studie zeigten Miller *et al.* (1997), dass eine Assoziation mit RPA das spezifische Binden von TP53 an DNA verhindert. Diese Daten werden daher von mehreren Autoren dahingehend interpretiert, dass die TP53-RPA-Wechselwirkung bei der Regulation von Replikations- und Reparaturprozessen eine Rolle spielt (Abramova *et al.*, 1997; Tchang & Mechali, 1999). Allerdings hat sowohl in Wildtyp- als auch in Krebszellen von Ovarien die Interaktion von TP53 mit RPA keinen Einfluss auf die frühen Schritte der DNA-Reparatur, so dass Riva *et al.* (2001) eine Beteiligung an den späteren Ereignissen der Reparatur vorschlagen.

In den hier durchgeführten Experimenten agierte TP53 nicht als Korrekturleser für nukleäre Pol  $\alpha$ -Prim. Diese Beobachtung wird von dem Befund unterstützt, dass in nicht gestressten Zellen nukleäres TP53 im Gegensatz zu cytoplasmatischem TP53 eine schwache Exonukleaseaktivität besitzt (Lilling *et al.* 2003). Die Autoren vermuten, dass die Funktion der cytoplasmatischen TP53-Exonukleaseaktivität bei der Prozessierung eukaryotischer RNA zu suchen sein könnte. Ausgehend von der Beobachtung, dass die TP53-Exonukleaseaktivität durch exogene Reize stimuliert werden kann (Huang, 1998), stellen Lilling *et al.* (2003) folgende Hypothesen auf: (1) Die TP53-Exonukleaseaktivität erkennt pathogene ssDNA im Cytoplasma und baut sie ab. (2) Die TP53-Exonukleaseaktivität dient als "Proofreader" für virale Reverse Transkriptasen, die keine intrinsische Korrektorexonuklease besitzen. Die Autoren gründen ihre Spekulation zum einen auf die Beobachtung, dass rekombinantes TP53 die Genauigkeit von HIV-RT erhöht (Bakhanashvili, 2001b), zum anderen darauf, dass eine HIV-Infektion die intrazelluläre TP53-Menge erhöht (Genini *et al.*, 2001). Da TP53 nach neuesten Erkenntnissen im Cytoplasma nicht gestresster Zellen mit Parc direkt interagiert und einen Komplex bildet (Nikolaev *et al.*, 2003), bedarf die Hypothese vom cytoplasmatischen 3'-5'-Korrekturlesen noch eingehender experimenteller Überprüfung.



Modifikationen von TP53, wie die Phosphorylierung oder Acetylierung (Ko & Prives, 1996; Prives & Manley, 2001), könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Fähigkeit zu einer physikalischen oder funktionellen Interaktion haben. In diesem Zusammenhang wäre es auch von Interesse, die Auswirkungen post-translationaler Modifikationen von TP53 auf seine Fähigkeit zu untersuchen, als Exonuklease zu dienen.

Aus der Fülle verschiedenartiger DNA-Schäden werden im  $\Phi X174am16$ -System nur die Basensubstitutionen detektiert. In den hier gezeigten Experimenten hat TP53 keinen Einfluss auf die von Pol  $\alpha$ -Prim verursachten Basensubstitutionen. Neben den Basensubstitutionen haben Pol  $\alpha$ -Prim und Pol  $\beta$  allerdings auch die Tendenz, mittels Deletionen oder Insertionen den Leserahmen zu verändern (Kunkel, 1986). Janus *et al.* (1999) spekulieren, dass TP53 durch Deletionen oder Insertionen hervorgerufene dsDNA-Schäden exonukleolytisch entfernen könnte, da es an solche Schäden bindet (Lee *et al.*, 1995).

Möglicherweise ist die TP53-Exonukleaseaktivität für die Rekombination von Bedeutung. Humanes RAD51 ist an Rekombinationsereignissen beteiligt. Es geht eine Wechselwirkung mit TP53 ein (Buchhop *et al.*, 1997) und stimuliert den von TP53 ausgeführten exonukleolytischen Abbau von DNA-Intermediaten (Süße *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine Hinweise auf eine Korrekturlesefunktion der TP53-Exonuklease für Pol  $\alpha$ -Prim induzierte Fehler gewonnen wurden. Dies gilt für Reaktionsbedingungen, welche die Fehlerhäufigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim nicht erhöhten.

### 5.2.2 WRN – ein Korrekturleser für Pol $\alpha$ -Prim?

Im Hinblick auf eine korrekturlesende Funktion für Pol  $\alpha$ -Prim wurde auch noch eine weitere humane 3'-5'-Exonuklease, das Werner Protein, untersucht. WRN besitzt in der Exonukleasedomäne drei konservierte Motive, die eine Sequenzhomologie zu den "Proofreading"-Exonukleasedomänen von *E. coli* Pol I und *E. coli* RNase D aufweist (Mushegian *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 1997; Mian, 1997). In den durchgeführten Experimenten mit äquimolarem Nukleotidangebot blieb WRN ohne Einfluss auf die Genauigkeit (Abb. 27). Bisher konnte Shevelev (nicht publizierte Daten) für WRN

lediglich unter Bedingungen mit nicht-äquimolarem Nukleotidangebot eine leichte Erhöhung der Genauigkeit von *E. coli* Pol I, Pol  $\delta$  und Pol  $\epsilon$  zeigen (Shevelev *et al.*, 2002). Es muss noch geklärt werden, ob dieser Effekt auch unter äquimolaren Nukleotidkonzentrationen von Bedeutung sein könnte oder sich auf Situationen beschränkt, welche die Fehlerhäufigkeit der Polymerase fördern. WRN interagiert physikalisch mit Pol  $\delta$  (Szekely *et al.*, 2000). Auch eine funktionelle Interaktion wurde beschrieben, welche die Polymeraseaktivität von Pol  $\delta$  in Abwesenheit von PCNA stimuliert (Kamath-Loeb *et al.*, 2000). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass WRN eine Rolle bei der Auflösung von blockierten Replikationsgabeln und sekundären Strukturen bei der Replikation spielen könnte (Kamath-Loeb *et al.*, 2000). Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern keine Hinweise auf ein exonukleolytisches Korrekturlesen von WRN für Pol  $\alpha$ -Prim induzierte Fehler, so dass die Funktion der 3'-5'-Exonukleaseaktivität weiterhin unklar bleibt.

Auch wenn TP53 und WRN in den hier vorgestellten Experimenten für Pol  $\alpha$ -Prim keine Korrekturlesefunktion ausführen, ist nicht auszuschließen, dass eine andere 3'-5'-Exonuklease in dieser Weise arbeitet. Skalski *et al.*, (2000b) identifizierten eine als ExoN bezeichnete, humane 3'-5'-Exonuklease, die Nukleotidanaloga vom 3'-Ende einer DNA ausbaut. Mit diesem Enzym wiesen Brown *et al.* (2002) in einem Vorwärts-Mutationssystem eine Genauigkeitserhöhung von Kalbsthymus Pol  $\alpha$ -Prim nach.

### 5.3 Die Replikationsgenauigkeit von Pol $\beta$

*In vivo* ist Pol  $\beta$  an der "short-patch" und "long-patch" Basen-Exzisionsreparatur (BER) beteiligt (Podlutzky *et al.*, 2001a; Podlutzky *et al.*, 2001b). Jedoch fehlt ihr eine intrinsische 3'-5'-Exonukleasefunktion (Tanabe *et al.*, 1979), die eine hohe Replikationsgenauigkeit gewährleisten würde.

In dieser Arbeit wurde für rekombinante hPol  $\beta$  auf verschiedenen DNA-Substraten (ssDNA und dsDNA mit Lücke) eine niedrige Genauigkeit bestimmt (Abb. 28). Dies steht mit den in zahlreichen Studien für Pol  $\beta$  verschiedener Herkunft auf ähnlichen Substraten in Vorwärts-Mutationssystemen und Opal-Reversionssystemen des M13-Phagen sowie im  $\Phi$ X174*am3*-Assay gemessenen niedrigen Genauigkeiten im Einklang (Kunkel & Alexander, 1986; Beard *et al.*, 1996; Osheroff *et al.*, 1999; Shevelev *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit den aus der Literatur bekannten Daten, wurde eine

ähnliche Genauigkeit auf der, in der BER physiologisch relevanten, mit einer Lücke versehenen dsDNA wie auf der eher unphysiologischen ssDNA gemessen (Abb. 28). So wurde gezeigt, dass die DNA-Synthese von Pol  $\beta$  auf einem Substrat aus Primer / ssDNA distributiv und auf einem Substrat mit einer kleinen Lücke und 5'-Phosphat prozessiv verläuft (Singhal & Wilson, 1993). Weiterhin ist bekannt, dass Pol  $\beta$  auf Lücken von 2-6 Nt im Vergleich mit einer Primer / ssDNA eine erhöhte katalytische Effektivität besitzt (Chagovetz *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1998; Osheroff *et al.*, 1999). Die Über-Alles-Basensubstitutions-Genauigkeit von Pol  $\beta$  scheint unabhängig davon auf Substraten mit 2-6 Nt Lücken und ssDNA-Matrizen sehr ähnlich zu sein (Chagovetz *et al.*, 1997; Osheroff *et al.*, 1999).

Möglicherweise wird die Genauigkeit der Pol  $\beta$  *in vivo* durch akzessorische Proteine erhöht. Ein Beispiel dafür ist die Erhöhung der katalytischen Rate, Genauigkeit und DNA-Bindeaffinität für T7-Polymerase und T4-Polymerase in Gegenwart von akzessorischen Proteinen (Tabor *et al.*, 1987; Munn & Alberts, 1991a; Munn & Alberts, 1991b; Young *et al.*, 1992).

### 5.3.1 Der Einfluss von TP53 und akzessorischer Proteine auf Pol $\beta$

Die geringe replikative Genauigkeit von Pol  $\beta$ , verbunden mit dem Risiko der Einführung von bis zu 10 Fehlern pro Tag / Zelle im Verlaufe von BER-Ereignissen (vgl. 1.1.2) lässt vermuten, dass *in vivo* Fehlerkorrektur-Mechanismen von Bedeutung sind.

Da die BER eine Multi-Enzym-Komplex Reaktion ist, ist nicht auszuschließen, dass in diesem System erst die zusätzliche Anwesenheit eines oder mehrerer Faktoren die Ausprägung eines Korrekturlesens für die Pol  $\beta$  durch eine autonome 3'-5'-Exonuklease ermöglicht. Aus diesem Grund wurden weitere akzessorische Proteine der BER in das  $\Phi$ X174 $am16$ -Reversionssystem einbezogen. In einem schrittweisen Vorgehen wurde zunächst der Einfluss der externen 3'-5'-Exonukleasen allein auf die Genauigkeit von Pol  $\beta$  untersucht und dann weitere Enzyme zusätzlich eingesetzt.

Zunächst wurde der Einfluss von TP53 auf die Genauigkeit von Pol  $\beta$  untersucht. Zhou *et al.* (2001) wiesen *in vitro* in Far-Western Analyse, Ko-Immünpräzipitation und Protein "Cross-linking" Experimenten eine physikalische Interaktion von TP53 mit Pol  $\beta$  nach. Aus diesem Grund erschien die Überprüfung des "Proofreading"-Konzepts nahe

liegend. Jedoch ergab die vorliegende funktionelle Analyse dieser beiden Interaktionspartner im  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem, dass TP53 mit seiner 3'-5'-Exonuklease allein nicht ausreichend für eine Genauigkeitserhöhung der hPol  $\beta$  war (Abb. 29), unabhängig davon, ob es sich um murines, bovines oder humanes TP53 handelte.

Für eine funktionelle Wechselwirkung von TP53 und Pol  $\beta$  ist möglicherweise die Anwesenheit von akzessorischen Proteinen von Bedeutung. RPA wurde unter diesem Blickwinkel in die Experimente einbezogen, da es Hinweise auf eine Stimulation der "long-patch" BER durch RPA gibt (DeMott *et al.*, 1998; Dianov *et al.*, 1999b). Außerdem interagieren TP53 und Pol  $\beta$  miteinander (Kolpashchikov *et al.*, 2000). Jedoch war auch in Anwesenheit von RPA keine von TP53 verursachte Genauigkeitserhöhung für Pol  $\beta$  feststellbar (Abb. 30). Nachdem der Einsatz von RPA ohne Einfluss auf die Genauigkeit blieb, scheint es naheliegend, die Funktion von RPA in den nachgeordneten Schritten der BER zu vermuten (DeMott *et al.*, 1998). Dabei können die intrinsischen Fähigkeiten von RPA, dsDNA zu entwinden (Georgaki & Hübscher, 1993; Treuner *et al.*, 1996) und FEN1 zu stimulieren (Biswas *et al.*, 1997) eine Rolle spielen.

### 5.3.2 Der Einfluss von APE1 und akzessorischer Proteine auf Pol $\beta$

Auch für APE1, einem zentralen Protein der BER, wurde eine physikalische Interaktion mit Pol  $\beta$  nachgewiesen (Bennett *et al.*, 1997), was eine nähere Untersuchung auf ein Korrekturlesen sinnvoll erscheinen ließ. Die Experimente wurden in Anwesenheit von hFEN1 durchgeführt, welches sowohl mit APE1 (Dianova *et al.*, 2001) als auch mit Pol  $\beta$  interagiert (Prasad *et al.*, 2000). In dem  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem war allerdings kein "Proofreading" durch APE1 für Pol  $\beta$  induzierte Fehler nachweisbar (Abb. 31). Zuvor zeigten Chou & Cheng (2002), dass APE1 mit seiner 3'-5'-Exonukleaseaktivität an einem Einzelstrangbruch befindliche Fehlpaarungen bzw. antivirale Nukleosidanaloga in Gegenwart von Pol  $\beta$  und Ligase I entfernen kann. Daraus wurde abgeleitet, dass APE1 auch nach dem endonukleolytischen Schnitt noch an der abasischen Stelle einer DNA verbleibt und von Pol  $\beta$  eingeführte Fehler Korrektur lesen kann (Chou & Cheng, 2002; Jiricny, 2002). Eine aktuelle Studie zur "short-patch" BER zeigte eine leicht erhöhte Genauigkeit der Pol  $\beta$  auf einer 1 Nt-Lücke in Anwesenheit von Uracil-DNA-Glykosylase, APE1 und DNA-Ligase I im Vergleich zu Pol  $\beta$  allein (Matsuda *et al.*, 2003). Als Ursache dafür stellten die Autoren eine durch

akzessorische Proteine oder die Gegenwart der 5'-dRP-Gruppe erhöhte Nukleotidselektion sowie ein Korrekturlesen durch APE1 zur Diskussion. Die in dieser Studie gewählten Reaktionsbedingungen provozierten den Einbau von Fehlern im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen. Da sich sowohl die Reaktionsbedingungen, die eingesetzten Proteine als auch die DNA-Substrate unterscheiden, ist ein direkter Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit der genannten Studie nicht möglich.

Das in dieser Arbeit vorgelegte Ergebnis lieferte hingegen keine Hinweise auf ein Korrekturlesen von APE1 für von Pol  $\beta$  verursachte Fehler. Dies kann daraufhin deuten, dass die Funktion von APE1 vorrangig in einer Koordination des BER-Vorganges durch die Bildung transienter Komplexe liegt (Bennett *et al.*, 1997; Mol *et al.*, 2000; Wilson & Kunkel, 2000), oder dass möglicherweise weitere akzessorische Proteine für eine funktionelle Interaktion notwendig sind. Außerdem gibt es Hinweise, dass die 3'-5'-Exonuklease im Vergleich zur Endonuklease lediglich eine geringe Aktivität besitzt. Sie zeigte im Vergleich zu rezessiver DNA keine Präferenz für dsDNA mit Lücke oder Einzelstrangbruch (Lebedeva *et al.*, 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass APE1 und Pol  $\beta$  bei ausgeglichenem Nukleotidgehalt funktionell nicht interagieren. Diese Beobachtung und die bereits erwähnte schwache Exonukleaseaktivität von APE1 (Lebedeva *et al.*, 2003) machen es eher unwahrscheinlich, dass APE1 *in vivo* bei ausgeglichenem Nukleotidgehalt auf Substraten mit einer Lücke ( $>1$  Nt) einen Beitrag zur Genauigkeit der Pol  $\beta$  leistet.

### **5.3.3 Der Einfluss von TP53 auf eine *in vitro* rekonstituierte "long-patch" BER**

Neueste Forschungsergebnisse liefern Hinweise auf eine Beteiligung des TP53 an der BER. Erstmals zeigten Offer *et al.* (1999), dass *in vitro* die BER-Aktivität in Zellextrakten mit der Menge des TP53 korreliert und somit TP53 direkt in die BER involviert ist. Kürzlich konnten Offer *et al.* (2001b) tatsächlich nachweisen, dass TP53 als DNA-Reparatur-Protein und nicht in der Rolle eines Transaktivators an der BER beteiligt ist. Transaktivierungsdefiziente TP53 Mutanten (TP53-22-23) wiesen *in vitro* und *in vivo* eine effizientere BER-Aktivität auf als das Wildtyp TP53. Außerdem beschrieben Offer *et al.* (2001a) nach einem genotoxischen Stresssignal eine zellzyklusspezifische Modulation der BER-Aktivität durch TP53. Nach Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlung auf die Zellen, steigerte stabilisiertes TP53 die mit der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase assoziierte BER-Aktivität,

wohingegen TP53 die BER-Aktivität in den, während der G<sub>2</sub>-M-Phase angereicherten Zellpopulationen überwiegend reduzierte und Apoptose induzierte.

Die Hinweise auf eine Beteiligung von TP53 an der BER, ließen eine *in vitro* Rekonstitution der BER-Reaktion sinnvoll erscheinen. Auf einem dsDNA-Substrat mit Lücke wurden die Proteine Pol  $\beta$ , TP53, APE1, FEN1 und T4-Ligase mit einbezogen (Abb. 32). Neben den bereits erwähnten Wechselwirkungen zwischen TP53 und Pol  $\beta$  sowie APE1 und Pol  $\beta$  sind in diesem Experiment noch weitere Protein-Protein Interaktionen zu berücksichtigen, die einen Einfluss auf die Funktionalität eines Korrekturlesens haben könnten. APE1 interagiert direkt mit TP53 (Gaiddon *et al.*, 1999) und ist außerdem *in vitro* und *in vivo* ein starker Aktivator von TP53 (Jayaraman *et al.*, 1997; Gaiddon *et al.*, 1999). Des Weiteren korrelierte die Stimulation der BER durch TP53 mit seiner Fähigkeit, *in vitro* direkt mit APE1 und Pol  $\beta$  zu interagieren (Zhou *et al.*, 2001). Trotz dieser vielfältigen Wechselwirkungen der beteiligten Enzyme war im  $\Phi$ X174 $\Delta$ 16-Reversionssystem keine Veränderung der Replikationsgenauigkeit zu beobachten (Abb. 32). Es war keine funktionelle Interaktion zwischen Polymerase  $\beta$  und autonomen 3'-5'-Exonukleasen nachweisbar.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die biologisch relevante Rolle von TP53 bei der BER vermutlich nicht in einem Korrekturlesen zu suchen ist. Stattdessen gibt es Hinweise darauf, dass TP53 in Anwesenheit von APE1 die Bindung von Pol  $\beta$  an die abasische DNA stabilisiert (Zhou *et al.*, 2001). Außerdem gelang es Seo *et al.* (2002) mittels Western-Blot Analyse eine deutlich reduzierte Expression von Pol  $\beta$  in TP53-defizienten Zellen nachzuweisen. In TP53-defizienten und TP53-Wildtyp Zellen waren keine Unterschiede in der Pol  $\beta$  mRNA-Expression detektierbar, die eine Erklärung für unterschiedliche Pol  $\beta$  Mengen in den Zellen hätten sein können. Zur Ursache der in TP53-defizienten Zellen reduzierten Pol  $\beta$  Menge stellten die Autoren die Hypothese auf, dass TP53 möglicherweise die Stabilität der Pol  $\beta$  erhöht. Vermutlich sind die beiden letztgenannten Phänomene die Mechanismen, mittels derer TP53 Einfluss auf die BER ausübt.

### 5.3.4 Der Einfluss von WRN auf Pol $\beta$

Als weiterer Kandidat für ein exonukleolytisches "Proofreading" bei der Basen-Exzisionsreparatur wurde das Werner Protein untersucht. WRN interagiert physikalisch und / oder funktionell mit zahlreichen Proteinen, die an der "long-patch" BER beteiligt sind, z.B. Pol  $\delta$  (Szekely *et al.*, 2000), PCNA (Lebel *et al.*, 1999), RPA (Brosh *et al.*, 1999) und FEN1 (Brosh *et al.*, 2001). Die hier durchgeführte funktionelle Analyse zeigte, dass WRN in Anwesenheit von FEN1 keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Pol  $\beta$  ausübte (Abb. 33). Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu den neuesten Forschungsergebnissen, die eine physikalische Interaktion von WRN mit Pol  $\beta$  belegen (Harrigan *et al.*, 2003). Die Autoren demonstrierten, dass WRN die "strand displacement"-Synthese von Pol  $\beta$  stimuliert. Diese Stimulation ist abhängig von der Helikaseaktivität des WRN. Außerdem wirken WRN und FEN1 synergistisch auf die "strand displacement"-Aktivität von Pol  $\beta$ . Des Weiteren entwindet WRN DNA-Substrate mit einer AP-Stelle, die zuvor von APE1 eingeschnitten wurden. Auf Grund dieser Hinweise, halten Harrigan *et al.* (2003) eine Beteiligung der WRN-Helikase an der BER durch eine Entwindung von alternativen DNA-Strukturen für wahrscheinlich.

Auf einem unvollständig entwundenen, gegabelten dsDNA-Substrat können die WRN-Helikase- und Exonukleaseaktivität zusammenarbeiten und so einen ssDNA-Strang freisetzen (Opresko *et al.*, 2001). Die Helikaseaktivität entwindet den DNA-Strang von der einen Seite, während die Exonukleaseaktivität den Strang von der anderen Seite verkürzt. Die Autoren vermuten, dass diese Fähigkeit von WRN eine Rolle bei der Rekombination spielen könnte. Des Weiteren entwickelten sie ein Modell, in dem WRN an der Prozessierung der Telomerenden beteiligt sein könnte. WRN interagiert physikalisch und funktionell mit Ku86/70 (Cooper *et al.*, 2000; Orren *et al.*, 2001). Das Ku-Heterodimer bindet an DNA-Telomere (Bianchi & de Lange, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass an den Telomeren sekundäre DNA-Strukturen gebildet werden (Griffith *et al.*, 1999). Möglicherweise spielt die WRN-Helikase bei der Auflösung dieser sekundären DNA-Strukturen an den Telomerenden eine Rolle (Opresko *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern keine Hinweise auf eine Funktion der WRN-Exonuklease als 3'-5'-Korrektorexonuklease. Die biologisch relevante Rolle der WRN-Exonuklease ist somit noch unklar. Auch die aktuellen Modelle zur Beteiligung von WRN an der BER (Harrigan *et al.*, 2003) und der Telomer-Prozessierung (Opresko *et al.*, 2001) stellen die WRN-Helikasefunktion in den Vordergrund.

Des Weiteren besteht natürlich die Möglichkeit, dass ein in dieser Arbeit nicht berücksichtigter Faktor eine Rolle für die Replikationsgenauigkeit von Pol  $\beta$  spielen kann. Ein möglicher Kandidat als weiteres akzessorisches Protein ist XRCC1, welches Teil des BER-Systems ist und physikalisch mit Pol  $\beta$  interagiert (Caldecott *et al.*, 1996). Außerdem bildet Pol  $\beta$  ein Multiprotein BER-Komplex mit DNA-Ligase I (Prasad *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass eine hier nicht untersuchte 3'-5'-Exonuklease, wie z.B. TREX1 (Höss *et al.*, 1999; Mazur & Perrino, 1999) oder eine bisher noch nicht entdeckte 3'-5'-Exonuklease als Korrekturleser für Pol  $\beta$  dienen könnte. So wiesen Shevelev *et al.* (2000) für Pol  $\beta$  mit einer unter nicht-äquimolaren Nukleotidverhältnissen (500:1) induzierten G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung ein externes Korrekturlesen durch nicht näher charakterisierte 3'-5'-Exonukleasen aus Rattenleber, Kalbsthymus und *E. coli* nach. Die Größe dieser korrekturlesenden 3'-5'-Exonukleasen von 28 kDa schließt aus, dass es dabei um das hier untersuchte TP53 oder WRN handeln könnte.

### 5.3.5 Der Einfluss von TP53 auf spezifische Fehlpaarungen bei der Replikation mit Pol $\beta$

Aus Arbeiten von Bakhanashvili (2001a; 2001b) ist bekannt, dass das rekombinante Tumorsuppressorprotein P53 auf DNA-Oligonukleotid-Substraten vorgegebene Purin-Purin-Fehlpaarungen effektiver abbaut als Purin-Pyrimidin-Fehlpaarungen. Auch für Substrate aus RNA / DNA gilt, dass TP53 bevorzugt Transversionsmutanten entfernt. Ebenfalls konnte für TP53 aus cytoplasmatischen Extrakten der LCC2-Zelllinie eine bevorzugte Exzision von Transversions- gegenüber Transitionsmutanten nachgewiesen werden (Lilling *et al.*, 2003).

TP53 hat zwar im  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem keinen nachweisbaren Einfluss auf die Über-Alles-Genauigkeit der hPol  $\beta$  (Abb. 29-32), aber es sollte näher untersucht werden, ob TP53 möglicherweise einen Einfluss auf einzelne der sieben im System detektierbaren Fehlpaarungen (vgl. 1.7, Tab. 1) haben könnte.

In dieser Arbeit wurden die Fehlerraten der einzelnen Fehlpaarungen von Pol  $\beta$  zunächst ohne TP53 auf ssDNA und dsDNA unter "nucleotide pool bias"-Bedingungen bestimmt (vgl. 4.9.4). Es konnte gezeigt werden, dass die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung sehr häufig auftritt und die T:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung nur sehr selten vorkommt (Tab. 8). Diese Beobachtung stimmt mit den von Beard *et al.* (1996) für rekombinante hPol  $\beta$  auf einem



partiell doppelsträngigen Substrat mit einer Lücke von 5 Nt bestimmten Tendenz überein. Auch nach Zugabe von TP53 bewegten sich die Werte für die Fehlerraten in der gleichen Größenordnung wie zuvor ohne TP53 (Tab. 8), die Veränderungen waren geringer als der Faktor 2. Weiterhin war die G:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung die häufigste und die T:T<sub>Matrize</sub>-Fehlpaarung nur sehr selten. Es war somit für Polymerase induzierte Fehler keine Präferenz des TP53 für den Ausbau einzelner Fehlpaarungen detektierbar.

#### 5.4 Zusammenfassung zum intermolekularem 3'-5'-Korrekturlesen

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass sich im Verlauf der funktionellen Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Polymerasen für die eingesetzten 3'-5'-Exonukleasen TP53, WRN und APE1 keine Hinweise auf ein externes 3'-5'-Korrekturlesen ergeben haben. Auf Grund der eindeutigen Resultate und der Vielzahl der Experimente, die unter verschiedenen Bedingungen auf unterschiedlichen DNA-Substraten und in An- und Abwesenheit akzessorischer Proteine durchgeführt wurden, bin ich zu der Auffassung gelangt, dass TP53, WRN und APE1 *in vivo* höchstwahrscheinlich nicht als "Proofreader" für Pol  $\alpha$ -Prim oder Pol  $\beta$  dienen. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die Genom stabilisierenden Eigenschaften von TP53, WRN und APE1, überwiegend unabhängig von deren intrinsischer Exonukleaseaktivität, möglicherweise auf eine direkte Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen zurückzuführen sind. Beispielsweise sind für TP53 Funktionen bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur (Ford & Hanawalt, 1997; Hwang *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2003) und der Basen-Exzisionsreparatur (Offer *et al.*, 1999; Offer *et al.*, 2001a; Offer *et al.*, 2001b; Zhou *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002; Offer *et al.*, 2002) beschrieben worden. Auch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von TP53 an DNA-Rekombinationsereignissen (Stürzbecher *et al.*, 1996; Wiesmüller *et al.*, 1996; Søe *et al.*, 2002; Stephan *et al.*, 2002), wobei hier auch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von Bedeutung sein könnte (Süße *et al.*, 2000). Für WRN sind in diesem Zusammenhang die aktuellen Modelle zur Beteiligung an der BER (Harrigan *et al.*, 2003) und der Telomer-Prozessierung (Opresko *et al.*, 2001) zu nennen, welche die WRN-Helikasefunktion in den Vordergrund stellen. APE1 ist mittels der Endonukleasefunktion und der Koordination des Reparaturvorgangs von herausragender Bedeutung für die BER (Mol *et al.*, 2000; Ranalli *et al.*, 2002).

Weitere experimentelle Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf eine 5'-3'-Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung. Im folgenden Abschnitt wird die Auswirkung der funktionellen Interaktion von Pol  $\delta$ -HE, FEN1 und Ligase diskutiert, wobei die Möglichkeit, von Pol  $\alpha$ -Prim induzierte Fehler zu entfernen, von besonderem Interesse ist.

## 5.5 Die Okazaki-Fragment-Prozessierung

Ein kritischer Prozess bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist die korrekte Entfernung der RNA-Primer der Okazaki-Fragmente während der Folgestrang-DNA-Synthese. Störungen dieses Prozesses haben starke mutagene Auswirkungen und können zur Entwicklung von Tumoren beitragen (Qiu *et al.*, 1999).

Die strukturspezifischen "Flap"-Endonukleasen spielen eine herausragende Rolle bei der Entfernung der RNA-Primer und der DNA-Reparatur (Bambara *et al.*, 1997; Klungland & Lindahl, 1997; Lieber 1997; Bae *et al.*, 2001; Shibata & Nakamura, 2002). Die 5'-3'-Nukleasen bauen sequenzunabhängig ein DNA-DNA und ein RNA-DNA-Duplex ab. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass in all diesen Systemen eine an die RNA-Primer anschließende DNA-Sequenz entfernt und repariert werden könnte. Wenn die initiale Elongation des RNA-Primers mit geringer Genauigkeit von Pol  $\alpha$ -Prim vollzogen wird, bietet die Entfernung der RNA benachbarter DNA eine Möglichkeit, die Genauigkeit zu erhöhen (Bhagwat & Nossal, 2001).

### 5.5.1 Die funktionelle Interaktion von Klenow Polymerase und hFEN1

Die *E. coli* Pol I ist eine Polymerase mit geringer Prozessivität, die an der DNA-Reparatur und der Entfernung der RNA-Primer bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung beteiligt ist (Kornberg & Baker, 1992). Pol I enthält drei enzymatische Aktivitäten in einem Polypeptid. Eine proteolytische Spaltung der Pol I in zwei aktive Fragmente (Klenow *et al.*, 1971) separiert das große C-terminale Fragment (Klenow Pol) mit einer Polymeraseaktivität und einer korrekturlesenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Brutlag & Kornberg, 1972; Kunkel, 1988) von einem kleinen N-terminalen Fragment mit einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität (Klett *et al.*, 1968). Ursprünglich als 5'-3'-Exonuklease beschrieben, besitzt diese Aktivität auch die Fähigkeit, strukturspezifisch an dem Übergang von doppelsträngiger DNA zu einem

einzelsträngigen Bereich ("flap") endonukleolytisch zu schneiden. Diese Aktivität ist funktionell homolog zu hFEN1 (Lyamichev *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob hFEN1 als Homologes der N-terminalen 5'-3'-Exonukleasedomäne der Pol I funktionell mit Klenow Pol, der die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Pol I fehlt, interagieren kann. Des Weiteren wurde analysiert, wie viele Basen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen entfernt wurden.

Es konnte festgestellt werden, dass Klenow Pol zu einer Überreplikation der DNA ("strand displacement"-Synthese) befähigt war (Abb. 35A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der für Klenow Pol beobachteten Überreplikation ausgehend von einem Einzelstrangbruch oder von einer vorgebildeten Replikationsgabel (Lechner & Richardson, 1983; Kornberg & Baker, 1992; Canceill *et al.*, 1999), wobei die *in vitro* Überreplikation der DNA 10-fach langsamer verläuft als die Synthese auf ssDNA-Matrizen (Hillebrand & Beattie, 1985). Die "strand displacement"-Synthese, gekennzeichnet durch die Verdrängung des ursprünglichen Primers mit der Fehlpaarung von der Matrize und der Bildung eines einzelsträngigen Bereichs ("flap"), war im Transfektionsexperiment durch sinkende Fehlerausbeuten nachweisbar (Tab. 9A). Die Fähigkeit zur Überreplikation von Klenow Pol und die damit verbundene Bildung eines verdrängten Einzelstrangs war eine Voraussetzung zum Studium einer funktionellen Interaktion von Klenow Pol mit hFEN1.

Die Polymeraseaktivität der Pol I verlängert auf dsDNA mit einem Einzelstrangbruch ("nick") den Primer und führt somit zur steten Neubildung eines Substrats, das von der 5'-3'-Exonuklease abgebaut wird, so dass eine effektive "nick translation" stattfindet (Lundquist & Olivera, 1982). Die "nick translation" der Pol I spielt eine Rolle bei der Exzisionsreparatur und der Okazaki-Fragment-Prozessierung (Kornberg & Baker, 1992). Neuere Studien auf Modell-Matrizen mit Lücken und "flaps" zeigten, dass die Polymerase- und 5'-Nukleaseaktivität der Pol I unabhängig voneinander agieren, obgleich die Nuklease mit höherer Wahrscheinlichkeit Moleküle geschnitten hat, die bereits von der Pol verlängert wurden (Xu *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass hFEN1 bei gleichzeitig stark erniedrigten Fehlerausbeuten (Tab. 9B) die Anhäufung von überreplizierten DNA-Molekülen durch Klenow Pol verhinderte (Abb. 35B). Somit konnte erstmals demonstriert werden, dass Klenow Pol und hFEN1 *in vitro* funktionell in einer effektiven "nick

translation“ interagieren können. Es gibt Hinweise, dass die 5'-3'-Exonuklease von Pol I nicht nur ein strukturell sondern auch ein funktionell homologes Protein von FEN1 ist. So fanden Sun *et al.* (2002), dass die Überexpression der N-terminalen 5'-3'-Nukleasedomäne von Pol I in einem *S. cerevisiae* rad27-Null-Stamm *in vivo* den Phänotyp, der mit dem Fehlen des Rad27 (FEN1-Homolog) assoziiert ist, unterdrückt.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit von der Reaktionszeit die Fehlerausbeuten bei der “nick translation“ (Tab. 9B) im Vergleich zur alleinigen Überreplikation (Tab. 9A) auf ein deutlich niedrigeres Niveau sanken.

Dieses Phänomen lässt sich zumindest teilweise dadurch erklären, dass Klenow Pol nur bei einem Teil der eingesetzten DNA tatsächlich eine ÜR durchführte (Abb. 35A). So beobachteten auch Canceill *et al.* (1999) für Klenow Pol in Abwesenheit vom Einzelstrang-Bindeprotein *E. coli* SSB eine relativ schwache “strand displacement“-Aktivität. Nach vollständiger Auffüllreaktion durch die Klenow Pol entsteht ein Substrat mit Einzelstrangbruch, für welches die Klenow Pol eine geringere Bindungsaffinität aufweist als für Substrate mit einer Lücke (Xu *et al.*, 2000). Die rasche Dissoziation der Polymerase vom Einzelstrangbruch ermöglicht es anderen Proteinen an die DNA zu binden und zu agieren. Dieser Einzelstrangbruch ist im Vergleich zur DNA mit Lücke ein gutes Substrat für die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von hFEN1 (Alleva & Doetsch, 2000). FEN1 kann durch die Freisetzung von Mononukleotiden zur Bildung einer Lücke führen, an die wiederum die Polymerase bevorzugt bindet und so ergibt sich erneut die Möglichkeit zur Initiation einer ÜR. Der so entstehende “flap“ wird dann von der hFEN1 prozessiert.

Ebenso wäre denkbar, dass die bei der Überreplikation gebildeten verdrängten Einzelstränge mit zunehmender Länge die “strand displacement“-Synthese behindern, bis diese zum Erliegen kommt (viele nur geringfügig oberhalb der RFII befindliche Reaktionsprodukte in Abb. 35A). Demgegenüber verhinderte die Schnittaktivität von hFEN1 die Entstehung langer störender “flaps“, was durch die so eingeleitete effektive “nick translation“ zur drastischen Abnahme der Fehlerausbeute führte.

Auch ein von Jin *et al.* (2003) entwickeltes Modell könnte eine Erklärung für die deutlich höhere Zahl der erhaltenen Fehlpaarungen bei alleiniger Anwesenheit der Klenow Pol bieten. Das Modell beruht auf der Annahme, dass bei einer im “strand displacement“-Modus befindlichen Polymerase eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass das 3'-Ende der DNA in das katalytische Zentrum der 3'-5'-Exonuklease gelangt und es so

zum Abbau des neusynthetisierten DNA-Stranges zurück bis zum Einzelstrangbruch kommt. Mehrere Zyklen von ÜR und nukleolytischem 3'-Abbau sowie Rehybridisierung des verdrängten Stranges einschließlich der Fehlpaarung könnten aufeinanderfolgen, wobei immer wieder ein Einzelstrangbruch als Substrat für die Ligase entsteht. In Gegenwart von hFEN1 würden entstehende 5'-"flaps" geschnitten werden, so dass eine Rehybridisierung dieser ausgeschlossen wird. Die "nick translation" führt somit zur Verschiebung der Position des Einzelstrangbruchs auf dem DNA-Substrat (Abb. 35B) und damit zur drastischen Reduktion der detektierbaren Fehlpaarungen (Tab. 9B). *In vivo* ist es für Pol I allerdings unwahrscheinlich, dass die 3'-5'-"Proofreading"-Exonuklease einen signifikanten Abbau von DNA mit ungepaartem 3'-Ende verursacht, da die 3'-5'-Exonuklease ~100-fach langsamer ist als die 5'-Exonuklease (Kuchta *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1997).

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in einer Reaktion mit Klenow Pol und T4-Ligase die geschlossen zirkuläre DNA (RFIV) über einen geringen Anteil an offen zirkulärer (RFII) und überreplizierter DNA dominierte (Abb. 35C). Die vorgegebenen Fehlpaarungen waren aber noch weitgehend vorhanden (Tab. 9C). Unter den gewählten Bedingungen war die Präferenz der T4-Ligase für ein DNA-Substrat mit Einzelstrangbruch offenbar größer als die der Polymerase, eine "strand displacement"-Synthese zu initiieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch in Gegenwart von T4-Ligase eine funktionelle Wechselwirkung von Klenow Pol und hFEN1 auftritt, die zur Entfernung der vorgegebenen Fehlpaarungen führt. Für die an Position 3 vorgegebene Fehlpaarung konnte demonstriert werden, dass hFEN1 den Fehler auch in Anwesenheit von T4-Ligase entfernt hat (Tab. 9D). Wohingegen die an Position 14 und 6 befindlichen Fehlpaarungen noch vollständig vorhanden waren (Tab. 9D). Die 5,6-fache Reduktion der Fehlerausbeute durch hFEN1 ist möglicherweise auf verschiedene Faktoren, wie die Substratspezifität von hFEN1 und die Substrateigenschaften der verwendeten DNA zurückzuführen. Vielleicht war die auf rezessiven 5'-Enden relativ schwache Exonukleaseaktivität von hFEN1 (Lieber, 1997) während der Auffüllreaktion in der Lage, die an Position 3 des Primers befindliche Fehlpaarung zu entfernen, im Gegensatz zu der an Position 6 und 14. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass doppelsträngige DNA mit einer einzelnen Fehlpaarung, thermodynamisch weniger stabil ist, als perfekt gepaarte DNA (Wallace *et al.*, 1979). Bei dem Primer mit der Fehlpaarung an

Position 14 war die Bildung eines stabilen Hybrids am 5'-Ende gewährleistet, wohingegen bei den Fehlpaarungen an Position 6 und 3 nur fünf bzw. zwei perfekt gepaarte Basen vorhanden waren, was zu einer deutlich erniedrigten Schmelztemperatur der 5'-flankierenden Region führte. Diese niedrige Schmelztemperatur erleichterte die Ablösung der 5'-Enden der Primer einschließlich der Fehlpaarung, was bei noch nicht vollständig aufgefüllter DNA in der Bildung einer Pseudo-Y-Struktur resultierte. hFEN schneidet Pseudo-Y-Substrate effektiver als Einzelstrangbruch-Substrate. Möglicherweise entsteht ein Pseudo-Y-Substrat mit drei verdrängten Nukleotiden auch häufiger als eines mit sechs oder hFEN1 besitzt eine größere Präferenz für das Pseudo-Y-Substrat mit drei verdrängten Nukleotiden. Unterstützt wird letztere Vermutung durch die Beobachtung, dass z.B. in der Kontrolle ohne hFEN1 kein Unterschied im Positionseffekt zwischen Position 3 und 6 zu beobachten war. Weniger wahrscheinlich, aber nicht auszuschließen war eine bereits einsetzende Überreplikation mit wenigen verdrängten Nukleotiden, die von hFEN1 geschnitten wurden und damit eine sofortige Ligation des Einzelstrangbruchs ermöglichten. Die Ligation der DNA verhinderte dann eine weitere "nick translation". Für verschiedene eu- und archaebakterielle FEN1-Homologe wurde eine effektive Ligation der geschnittenen Substrate mit T4-Ligase nachgewiesen (Kaiser *et al.*, 1999).

Von Interesse wäre der zusätzliche Einsatz vom Einzelstrang-Bindeprotein *E. coli* SSB, das die "strand displacement"-Synthese der Klenow Pol stimuliert (Canceill *et al.*, 1999), und so möglicherweise auch in Gegenwart von Ligase eine "nick translation" ermöglicht.

Es gibt bereits Hinweise auf ein 5'-3'-Korrekturlesen bei Prokaryoten. Für das Replikationssystem des T4-Bakteriophagen wurde in einer gekoppelten Führungs- und Folgestrang-DNA-Synthese die Entfernung von durchschnittlich 30 Nukleotiden beschrieben, die sich benachbart zum RNA-Primer befanden (Bhagwat & Nossal, 2001). T4-RNase H, ein Homologes von hFEN1, katalysiert die Entfernung der "flap"-DNA. Da bisher für die 5'-Nukleaseaktivität der *E. coli* Pol I noch nicht nachgewiesen wurde, ob bei der Okazaki-Fragment-Reifung auch an den RNA-Primer angrenzende DNA-Sequenzen entfernt werden, wäre es von Interesse dies näher zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Klenow Pol und hFEN1 funktionell in einer effektiven "nick translation" zusammenwirken. Die vorgegebenen Fehlpaarungen

wurden durch dieses 5'-3'-Korrekturlesen sehr effizient entfernt. In Anwesenheit von T4-Ligase wurde die "nick translation" allerdings weitgehend unterbunden. Vermutlich besaß die T4-Ligase eine höhere Präferenz für das DNA-Substrat mit Einzelstrangbruch als die Klenow Polymerase.

### 5.5.2 Die funktionelle Interaktion von hPol $\delta$ -HE mit hFEN1

Es war nun von besonderem Interesse mit humanen Proteinen zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß eine funktionelle Interaktion von Pol  $\delta$ -HE und FEN1 zu einem 5'-3'-Korrekturlesen führen könnte.

Für humane Pol  $\delta$ -HE (hPol  $\delta$ , hPCNA, hRFC) konnte in Anwesenheit von hRPA und T4-Ligase eine "strand displacement"-Synthese nachgewiesen werden (Abb. 36A), die in einer Verdrängung der vorgegebenen Fehlpaarungen und somit in einer geringen Fehlerausbeute resultierte (vgl. Tab 10A). Die Fähigkeit zur Überreplikation der humanen Pol  $\delta$ -HE bestätigt die kürzlich von Maga *et al.* (2001b) für Pol  $\delta$  aus Kalbsthymus und von Ayyagari *et al.* (2003) für Pol  $\delta$ -HE aus *S. cerevisiae* beschriebenen Beobachtungen. In wie weit dies eine intrinsische wie in ersterem oder eine PCNA- und RFC-abhängige Eigenschaft wie in letzterem Fall ist, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit war in Anwesenheit von hRPA und T4-Ligase für hPol  $\delta$ -HE und hFEN1 eine funktionelle Interaktion zu beobachten, die in einer effektiven "nick translation" mit anschließender Ligation des Substrats resultierte (Abb. 36B). Die Fehlerausbeute war dementsprechend sehr gering (Tab. 10B). Im Abstand von 14 Nt waren nur noch 9-16 %, im Abstand von 6 und 3 Nt nur noch 2-3 % der vorgegebenen Fehler detektierbar (Abb. 37). Dieses Ergebnis liefert erstmals Hinweise darauf, dass im humanen System Pol  $\delta$  und FEN1 gemeinsam die Fähigkeit besitzen könnten, in einer "nick translation" nicht nur die von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierten RNA-Primer (~10 Ribonukleotide), sondern auch Teile des DNA-Primers zu entfernen. Auf diese Weise würde bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung ein 5'-3'-Korrekturlesen für von Pol  $\alpha$ -Prim verursachte Fehler stattfinden können. Diese aus einer *in vitro* Rekonstitution der Okazaki-Fragment-Prozessierung mit rekombinanten humanen Enzymen erhaltenen Ergebnisse zur Fähigkeit eines 5'-3'-Nukleotidausbaus stehen im Einklang mit den in einer aktuellen Studie von Ayyagari *et al.* (2003) für rekombinante Enzyme aus

*S. cerevisiae* erzielten Werte. Die Autoren beschreiben für den Bereich nach dem RNA / DNA-Übergang einen Ausbau von 8-12 Nukleotiden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit das Modell eines 5'-3'-Korrekturlesens für Fehler der Pol  $\alpha$ -Prim bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum 3'-5'-Korrekturlesen und 5'-3'-Korrekturlesen legen die Folgerung nahe, dass ein effektives Entfernen der von Pol  $\alpha$ -Prim verursachten Fehler im Verlauf der Okazaki-Fragment-Prozessierung die Bedeutung eines 3'-5'-Korrekturlesens durch autonome 3'-5'-Korrekturlexonukleasen abschwächt. Eine Fehlerrate von 1/10000 ist für Pol  $\alpha$ -Prim mehr als ausreichend, wenn sie nur eine geringe Zahl von Nukleotiden als Primer synthetisiert. Zudem können die gebildeten Fehler durch eine 5'-3'-Fehlerkorrektur bei der Okazaki-Fragment-Prozessierung eliminiert werden.

Da die von Pol  $\alpha$ -Prim erzeugten Fehler recht effektiv von Pol  $\delta$ -HE und FEN1 wieder entfernt werden können, ist es vielleicht verständlich, dass die der Pol  $\alpha$ -Prim phylogenetisch einmal innewohnende 3'-5'-Exonuklease im Verlauf der Evolution verloren ging.

## 5.6 Ausblick

Das  $\Phi$ X174 $am16$ -Reversionssystem mit den vorgegebenen Fehlpaarungen hat sich zur Untersuchung der *in vitro* Okazaki-Fragment-Prozessierung bewährt. Mit diesem System können weitergehende Untersuchungen zur prokaryotischen und eukaryotischen Okazaki-Fragment-Reifung durchgeführt werden. So wurde beispielsweise für *E. coli* Pol I noch nicht näher untersucht, ob dieses Protein mit seiner Polymeraseaktivität und 5'-3'-Exonukleaseaktivität auch in der Lage ist, an den RNA-Primer anschließende DNA-Sequenzen zu entfernen.

Weitere Studien zur humanen *in vitro* Okazaki-Fragment-Prozessierung könnten klären, wie viele Nukleotide maximal durch die funktionelle Wechselwirkung von Pol  $\delta$ -HE und FEN1 entfernt werden können. Außerdem wäre die Einbeziehung der humanen Ligase I zweckmäßig. Des Weiteren wäre der Einsatz von RNA / DNA-Primern sinnvoll, um so zu bestimmen, wie viele Nukleotide ausgehend vom RNA-DNA-Übergang entfernt werden.



---

Pol  $\delta$ -HE und FEN1 sind zwar ausreichend für eine effektive "nick translation", aber dennoch sollte auch humane Dna2 in die Untersuchungen einbezogen werden. Aus dem Hefesystem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Dna2 an der Okazaki-Fragment-Prozessierung (Budd & Campbell, 1997; Bae *et al.*, 2001; Ayyagari *et al.*, 2003). Anzustreben wäre die Etablierung eines Genauigkeitssystems, bei dem für von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierte RNA / DNA-Primer eine 5'-3'-Fehlerkorrektur durch Pol  $\delta$ -HE und FEN1 beobachtet werden könnte.

## 6. Zusammenfassung

Die Zellen eines Tumors prägen einen Mutatorphänotypen aus. Der Mutatorphänotyp resultiert aus Mutationen in Genen, die eine Funktion in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität haben (Loeb, 2001). Diese Mutationen können bei fehlerhafter DNA-Synthese oder Reparatur eines DNA-Schadens entstehen. Es gibt Hinweise darauf, dass Polymerase induzierte Fehler, die nicht 3'-5'-korrekturgelesen werden, bei Säugetieren zur Tumorgenese beitragen (Goldsby *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2002). An Replikation und Reparatur sind zwei relativ ungenau replizierende DNA-Polymerasen beteiligt, Pol  $\alpha$ -Prim und Pol  $\beta$ , denen eine intrinsische 3'-5'-Korrektur-exonuklease fehlt. Für diese Polymerasen wurde das Modell vom 3'-5'-Korrekturlesen durch autonome 3'-5'-Exonukleasen überprüft. Ausgewählt wurden drei 3'-5'-Exonukleasen, denen eine herausragende Rolle bei Aufrechterhaltung der genomischen Integrität der Zelle zugeschrieben wird: Das Tumorsuppressorprotein P53 (TP53), das Werner Protein (WRN) und die Apurinische / Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1). Diese Proteine zeichnen sich ebenfalls durch vielfältige Interaktionen mit an der Replikation und Reparatur beteiligten Enzymen aus. Deswegen lag die Vermutung nahe, sie könnten als 3'-5'-Korrekturleser für die Pol  $\alpha$ -Prim oder Pol  $\beta$  einen Beitrag zu Replikationsgenauigkeit und damit zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität leisten.

In dieser Arbeit waren in einer Vielzahl von Experimenten auf verschiedenen DNA-Substraten des  $\Phi$ X174 $am$ 16-Reversionssystem und mit rekombinanten Proteinen unterschiedlicher Herkunft keine Hinweise auf ein 3'-5'-Korrekturlesen von TP53 oder WRN für Pol  $\alpha$ -Prim induzierte Fehler nachweisbar. Auch die Anwesenheit vom Einzelstrang-Bindeprotein RPA, als Interaktionspartner von Pol  $\alpha$ -Prim und TP53, war ohne Auswirkungen auf die Replikationsgenauigkeit.

In einer *in vitro* rekonstituierten "long-patch" Basen-Exzisionsreparatur (BER) war für Pol  $\beta$  keine Genauigkeitserhöhung durch TP53, WRN oder APE1 feststellbar. Auch die Kombination von den Interaktionspartnern TP53 und APE1 war ohne Einfluss auf die Genauigkeit. In diesen Reaktionen wurden ebenfalls akzessorische Proteine, die mit den Polymerasen und Exonukleasen interagieren, wie die "Flap"-Endonuklease 1 (FEN1) und RPA einbezogen. Diese experimentellen Daten unterstützen das eingangs vorgestellte Modell vom intermolekularen 3'-5'-Korrekturlesen durch TP53, WRN und APE1 nicht. Für APE1 als einem zentralen Protein der BER ist die Beteiligung an

Reparaturereignissen nachgewiesen, aber vermutlich sind auch TP53 und WRN in einem alternativen Mechanismus direkt an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt.

Ein kritischer Prozess zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist die korrekte Prozessierung der Okazaki-Fragmente. Bei diesem Vorgang werden die von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierten RNA-Primer des Folgestrangs wieder entfernt. Es wurde die Vermutung überprüft, inwiefern dieser Mechanismus als sog. 5'-3'-Fehlerkorrektur auch geeignet ist, die von Pol  $\alpha$ -Prim mit niedriger Genauigkeit replizierten DNA-Bereiche zu entfernen.

Die vorliegende Arbeit lieferte Hinweise auf eine 5'-3'-Fehlerkorrektur während der Okazaki-Fragment-Prozessierung. Erstmals konnte mit rekombinantem, humanem Polymerase  $\delta$ -Holoenzym (Pol  $\delta$ -HE) und humaner 5'-3'-"Flap"-Endonuklease 1 und in Anwesenheit von Ligase die Entfernung vorgegebener Fehlpaarungen nachgewiesen werden. Im Abstand von bis zu 14 Nukleotiden vom 5'-Ende des Primers befindliche Fehlpaarungen wurden durch die funktionelle Interaktion von hPol  $\delta$ -HE und hFEN1 effektiv entfernt. Diese Daten liefern somit Hinweise auf ein effektives 5'-3'-Korrekturlesen für von Pol  $\alpha$ -Prim verursachte Fehler.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die in einer aktuellen Studie im Hefesystem gewonnen wurden (Ayyagari *et al.*, 2003), und mit einem kürzlich entwickelten Modell zur Okazaki-Fragment-Prozessierung (Bae *et al.*, 2001).

## 7. Literaturverzeichnis

**Abramova NA, Russell J, Botchan M, Li R.**

Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7186-91.

**Achanta G, Pelicano H, Feng L, Plunkett W, Huang P.**

Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8723-9.

**Ahn J, Kraynov VS, Zhong X, Werneburg BG, Tsai MD.**

DNA polymerase beta: effects of gapped DNA substrates on dNTP specificity, fidelity, processivity and conformational changes. *Biochem J.* 1998 Apr 1;331 ( Pt 1):79-87.

**Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W.**

Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7706-17.

**Alleva JL, Doetsch PW.**

Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Rad2 protein, a FEN-1 homolog. *Nucleic Acids Res.* 1998 Aug 15;26(16):3645-50.

**Alleva JL, Zuo S, Hurwitz J, Doetsch PW.**

*In vitro* reconstitution of the *Schizosaccharomyces pombe* alternative excision repair pathway. *Biochemistry.* 2000 Mar 14;39(10):2659-66.

**Alleva JL, Doetsch PW.**

The nature of the 5'-terminus is a major determinant for DNA processing by *Schizosaccharomyces pombe* Rad2p, a FEN-1 family nuclease. *Nucleic Acids Res.* 2000 Aug 1;28(15):2893-901.

**Appleyard RK.**

Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K 12. *Genetics.* 1954 39:440-452.

**Atrazhev A, Zhang S, Grosse F.**

Single-stranded DNA binding protein from calf thymus. Purification, properties, and stimulation of the homologous DNA-polymerase-alpha-primase complex. *Eur J Biochem.* 1992 Dec 15;210(3):855-65.

**Ayyagari R, Gomes XV, Gordenin DA, Burgers PM.**

Okazaki fragment maturation in yeast. I. Distribution of functions between FEN1 and DNA2. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1618-25.

**Bae SH, Choi E, Lee KH, Park JS, Lee SH, Seo YS.**

Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* possesses a single-stranded DNA-specific endonuclease activity that able to act on double-stranded DNA in the presence of ATP. *J Biol Chem.* 1998 Oct 9;273(41):26880-90.

**Bae SH, Seo YS.**

Characterization of the enzymatic properties of the yeast dna2 Helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):38022-31.

**Bae SH, Bae KH, Kim JA, Seo YS.**

RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature.* 2001 Jul 26;412(6845):456-61.

**Bakhanashvili M.**

Exonucleolytic proofreading by p53 protein. *Eur J Biochem.* 2001a Apr;268(7):2047-54.

**Bakhanashvili M.**

p53 enhances the fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Oncogene*. 2001b Nov 15;20(52):7635-44.

**Ballal K, Zhang W, Mukhopadhyay T, Huang P.**

Suppression of mismatched mutation by p53: a mechanism for guarding genomic integrity. *J Mol Med*. 2002 Jan;80(1):25-32.

**Bambara RA, Murante RS, Henricksen LA.**

Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem*. 1997 Feb 21;272(8):4647-50.

**Bauer GA, Burgers PM.**

The yeast analog of mammalian cyclin/proliferating-cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Oct;85(20):7506-10.

**Beard WA, Osheroff WP, Prasad R, Sawaya MR, Jaju M, Wood TG, Kraut J, Kunkel TA, Wilson SH.**

Enzyme-DNA interactions required for efficient nucleotide incorporation and discrimination in human DNA polymerase beta. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12141-4.

**Bebenek K, Joyce CM, Fitzgerald MP, Kunkel TA.**

The fidelity of DNA synthesis catalyzed by derivatives of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 1990 Aug 15;265(23):13878-87.

**Bell SP, Dutta A.**

DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:333-74.

**Bennett RA, Wilson DM, Wong D, Demple B.**

Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 8;94(14):7166-9.

**Benzinger R, Kleber I, Huskey R.**

Transfection of *Escherichia coli* spheroplasts. I. General facilitation of double-stranded deoxyribonucleic acid infectivity by protamine sulfate. *J Virol*. 1971 May;7(5):646-50.

**Bessho T, Sancar A.**

Human DNA damage checkpoint protein hRAD9 is a 3'-5' exonuclease. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7451-4.

**Bhagwat M, Nossal NG.**

Bacteriophage T4 RNase H removes both RNA primers and adjacent DNA from the 5' end of lagging strand fragments. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):28516-24.

**Bialek G, Nasheuer HP, Goetz H, Grosse F.**

Exonucleolytic proofreading increases the accuracy of DNA synthesis by human lymphocyte DNA polymerase alpha-DNA primase. *EMBO J*. 1989 Jun;8(6):1833-9.

**Bianchi A, de Lange T.**

Ku binds telomeric DNA *in vitro*. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23;274(30):21223-7.

**Biswas EE, Zhu FX, Biswas SB.**

Stimulation of RTH1 nuclease of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by replication protein A. *Biochemistry*. 1997 May 20;36(20):5955-62.

**Blackwell LJ, Borowiec JA, Masrangelo IA.**

Single-stranded-DNA binding alters human replication protein A structure and facilitates interaction with DNA-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4798-807.

**Blander G, Kipnis J, Leal JF, Yu CE, Schellenberg GD, Oren M.**

Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J Biol Chem.* 1999 Oct 8;274(41):29463-9.

**Bradford MM.**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

**Brosh RM Jr, Orren DK, Nehlin JO, Ravn PH, Kenny MK, Machwe A, Bohr VA.**

Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J Biol Chem.* 1999 Jun 25;274(26):18341-50.

**Brosh RM, von Kobbe C, Sommers JA, Karmakar P, Opresko PL, Piotrowski J, Dianova I, Dianov GL, Bohr VA.**

Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J.* 2001 Oct 15;20(20):5791-5801.

**Brosh RM Jr, Driscoll HC, Dianov GL, Sommers JA.**

Biochemical characterization of the WRN-FEN-1 functional interaction. *Biochemistry.* 2002 Oct 8;41(40):12204-16.

**Brown KR, Weatherdon KL, Galligan CL, Skalski V.**

A nuclear 3'-5' exonuclease proofreads for the exonuclease-deficient DNA polymerase alpha. *DNA Repair (Amst).* 2002 Oct 1;1(10):795-810.

**Brutlag D, Kornberg A.**

Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. A proofreading function for the 3'-5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J Biol Chem.* 1972 Jan 10;247(1):241-8.

**Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC.**

Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res.* 1997 Oct 1;25(19):3868-74.

**Budd ME, Campbell JL.**

A yeast replicative helicase, Dna2 helicase, interacts with yeast FEN-1 nuclease in carrying out its essential function. *Mol Cell Biol.* 1997 Apr;17(4):2136-42.

**Burgers PM, Gerik KJ.**

Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19756-62.

**Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.**

Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999 Dec;9(12):M57-60.

**Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S.**

XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 1996 Nov 15;24(22):4387-94.

**Canceill D, Viguera E, Ehrlich SD.**

Replication slippage of different DNA polymerases is inversely related to their strand displacement efficiency. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27481-90.

**Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, Abbondandolo A, Caldecott K, Frosina G.**

Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23970-5.

**Capson TL, Peliska JA, Kaboord BF, Frey MW, Lively C, Dahlberg M, Benkovic SJ.**

Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry.* 1992 Nov 17;31(45):10984-94.

**Carty MP, Levine AS, Dixon K.**

HeLa cell single-stranded DNA-binding protein increases the accuracy of DNA synthesis by DNA polymerase alpha *in vitro*. *Mutat Res.* 1992 Jun;274(1):29-43.

**Chagovetz AM, Sweasy JB, Preston BD.**

Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27501-4.

**Chen YC, Bohn EW, Planck SR, Wilson SH.**

Mouse DNA polymerase alpha. Subunit structure and identification of a species with associated exonuclease. *J Biol Chem.* 1979 Nov 25;254(22):11678-87.

**Chen X, Zuo S, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J, Goodman MF.**

Fidelity of eucaryotic DNA polymerase delta holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17677-82.

**Chou KM, Kukhanova M, Cheng YC.**

A novel action of human apurinic/aprimidinic endonuclease: excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31009-15.

**Chou KM, Cheng YC.**

An exonucleolytic activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):655-9.

**Cooper MP, Machwe A, Orren DK, Brosh RM, Ramsden D, Bohr VA.**

Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):907-12.

**Cox LS, Hupp T, Midgley CA, Lane DP.**

A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication. *EMBO J.* 1995 May 1;14(9):2099-105.

**DeMott MS, Zigman S, Bambara RA.**

Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem.* 1998 Oct 16;273(42):27492-8.

**Demple B, Herman T, Chen DS.**

Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11450-4.

**Derbyshire V, Freemont PS, Sanderson MR, Beese L, Friedman JM, Joyce CM, Steitz TA.**

Genetic and crystallographic studies of the 3'-5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science.* 1988 Apr 8;240(4849):199-201.

**Dianov GL, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA.**

Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem.* 1999a May 14;274(20):13741-3.

**Dianov GL, Jensen BR, Kenny MK, Bohr VA.**

Replication protein A stimulates proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of abasic sites in DNA by human cell extracts. *Biochemistry.* 1999b Aug 24;38(34):11021-5.

**Dianova II, Bohr VA, Dianov GL.**

Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry.* 2001 Oct 23;40(42):12639-44.

**Donlin MJ, Patel SS, Johnson KA.**

Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction. *Biochemistry.* 1991 Jan 15;30(2):538-46.

**Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E.**

Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. EMBO J. 1992 Feb;11(2):769-76.

**Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E.**

Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. Nature. 1993 Sep 2;365(6441):79-82.

**EI-Deiry WS.**

Regulation of p53 downstream genes. Semin Cancer Biol. 1998;8(5):345-57.

**Engler MJ, Lechner RL, Richardson CC.**

Two forms of the DNA polymerase of bacteriophage T7. J Biol Chem. 1983 Sep 25;258(18):11165-73.

**Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR.**

Going APE over ref-1. Mutat Res. 2000 Oct 16;461(2):83-108.

**Featherstone C, Jackson SP.**

Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? Mutat Res. 1999 May 14;434(1):3-15.

**Feng L, Achanta G, Pelicano H, Zhang W, Plunkett W, Huang P.**

Role of p53 in cellular response to anticancer nucleoside analog-induced DNA damage. Int J Mol Med. 2000 Jun;5(6):597-604.

**Fersht AR, Knill-Jones JW.**

DNA polymerase accuracy and spontaneous mutation rates: frequencies of purine.purine, purine.pyrimidine, and pyrimidine.pyrimidine mismatches during DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Jul;78(7):4251-5.

**Fersht AR, Knill-Jones JW.**

Fidelity of replication of bacteriophage phi X174 DNA *in vitro* and *in vivo*. J Mol Biol. 1983 Apr 25;165(4):633-54.

**Fijalkowska IJ, Schaaper RM.**

Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 2;93(7):2856-61.

**Ford JM, Hanawalt PC.**

Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. J Biol Chem. 1997 Oct 31;272(44):28073-80.

**Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, Laval J, Dogliotti E.**

The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. J Biol Chem. 1999 May 21;274(21):15230-6.

**Frank P, Braunshofer-Reiter C, Wintersberger U.**

Yeast RNase H(35) is the counterpart of the mammalian RNase HI, and is evolutionarily related to prokaryotic RNase HII. FEBS Lett. 1998 Jan 2;421(1):23-6.

**Friedrich-Heineken E, Henneke G, Ferrari E, Hübscher U.**

The acetylable lysines of human Fen1 are important for endo- and exonuclease activities. J Mol Biol. 2003 Apr 18;328(1):73-84.

**Frick DN, Richardson CC.**

DNA primases. Annu Rev Biochem. 2001;70:39-80.

**Fritsche M, Haessler C, Brandner G.**

Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. Oncogene. 1993 Feb;8(2):307-18.



**Gaiddon C, Moorthy NC, Prives C.**

Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 *in vivo*. EMBO J. 1999 Oct 15;18(20):5609-21.

**Gannon JV, Lane DP.**

p53 and DNA polymerase alpha compete for binding to SV40 T antigen. Nature. 1987 Oct 1-7;329(6138):456-8.

**Gary R, Kim K, Cornelius HL, Park MS, Matsumoto Y.**

Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. J Biol Chem. 1999 Feb 12;274(7):4354-63.

**Genini D, Sheeter D, Rought S, Zaunders JJ, Susin SA, Kroemer G, Richman DD, Carson DA, Corbeil J, Leoni LM.**

HIV induces lymphocyte apoptosis by a p53-initiated, mitochondrial-mediated mechanism. FASEB J. 2001 Jan;15(1):5-6.

**Georgaki A, Hübscher U.**

DNA unwinding by replication protein A is a property of the 70 kDa subunit and is facilitated by phosphorylation of the 32 kDa subunit. Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3659-65.

**Goodman MF.**

Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 30;94(20):10493-5.

**Goldsby RE, Lawrence NA, Hays LE, Olmsted EA, Chen X, Singh M, Preston BD.**

Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. Nat Med. 2001 Jun;7(6):638-9.

**Goldsby RE, Hays LE, Chen X, Olmsted EA, Slayton WB, Spangrude GJ, Preston BD.**

High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15560-5.

**Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H.**

Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Apr;5(4):239-46.

**Gray H, Wong TW.**

Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. J Biol Chem. 1992 Mar 25;267(9):5835-41.

**Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA.**

The Werner syndrome protein is a DNA helicase. Nat Genet. 1997 Sep;17(1):100-3.

**Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T.**

Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell. 1999 May 14;97(4):503-14.

**Grossberger D, Clough W.**

Incorporation into DNA of the base analog 2-aminopurine by the Epstein-Barr virus-induced DNA polymerase *in vivo* and *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec;78(12):7271-5.

**Grosse F, Krauss G, Knill-Jones JW, Fersht AR.**

Accuracy of DNA polymerase alpha in copying natural DNA. EMBO. 1983 2;(9):1515-19

**Grosse F.**

DNA-Polymerase alpha aus Kalbsthymus: Untersuchungen zum Mechanismus und zur Genauigkeit der *in vitro* Replikation natürlicher DNA. Habilitation, Medizinische Hochschule Hannover 1985

**Harrigan JA, Opresko PL, Von Kobbe C, Kedar PS, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA.**

The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J Biol Chem.* 2003 Mar 27 [epub ahead of print]

**Harrington JJ, Lieber MR.**

The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J.* 1994 Mar 1;13(5):1235-46.

**Hartmann H.**

Biochemische Untersuchungen zur Rolle des Tumorsuppressorproteins P53 bei der Replikation und Reparatur der DNA. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena 2001.

**He Z, Brinton BT, Greenblatt J, Hassell JA, Ingles CJ.**

The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1223-32.

**Hillebrand GG, Beattie KL.**

Influence of template primary and secondary structure on the rate and fidelity of DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1985 Mar 10;260(5):3116-25.

**Hoeijmakers JH.**

Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):366-74.

**Hohn KT, Grosse F.**

Processivity of the DNA polymerase alpha-primase complex from calf thymus. *Biochemistry.* 1987 May 19;26(10):2870-8.

**Holmes AM, Haber JE.**

Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):415-24.

**Holmquist GP.**

Endogenous lesions, S-phase-independent spontaneous mutations, and evolutionary strategies for base excision repair. *Mutat Res.* 1998 May 25;400(1-2):59-68.

**Hori K, Mark DF, Richardson CC.**

Deoxyribonucleic acid polymerase of bacteriophage T7. Purification and properties of the phage-encoded subunit, the gene 5 protein. *J Biol Chem.* 1979 Nov 25;254(22):11591-7.

**Höss M, Robins P, Naven TJ, Pappin DJ, Sgouros J, Lindahl T.**

A human DNA editing enzyme homologous to the *Escherichia coli* DnaQ/MutD protein. *EMBO J.* 1999 Jul 1;18(13):3868-75.

**Huang P.**

Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene.* 1998 Jul 23;17(3):261-70.

**Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian IS, Campisi J.**

The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-5' exonuclease. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):114-6.

**Huang S, Beresten S, Li B, Oshima J, Ellis NA, Campisi J.**

Characterization of the human and mouse WRN 3'-5' exonuclease. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):2396-405.

**Hübscher U, Seo YS.**

Replication of the lagging strand: a concert of at least 23 polypeptides. *Mol Cells.* 2001 Oct 31;12(2):149-57.

**Hübscher U, Maga G, Spadari S.**

Eukaryotic DNA Polymerases. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:133-163.

**Hughes P, Tratner I, Ducoux M, Piard K, Baldacci G.**

Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase delta by PCNA-affinity chromatography of mouse FM3A cell extracts. *Nucleic Acids Res.* 1999 May 15;27(10):2108-14.

**Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G.**

Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):424-8.

**Idriss HT, Al-Assar O, Wilson SH.**

DNA polymerase beta. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Apr;34(4):321-4.

**Jackson AL, Loeb LA.**

The mutation rate and cancer. *Genetics.* 1998 Apr;148(4):1483-90.

**Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W.**

The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jan;55(1):12-27.

**Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, Curran T, Xanthoudakis S, Prives C.**

Identification of redox / repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* 1997 Mar 1;11(5):558-70.

**Jin YH, Ayyagari R, Resnick MA, Gordenin DA, Burgers PM.**

Okazaki fragment maturation in yeast. II. Cooperation between the polymerase and 3'-5'-exonuclease activities of Pol delta in the creation of a ligatable nick. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1626-33.

**Jiricny J.**

An APE that proofreads. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):593-4.

**Joyce CM.**

How DNA travels between the separate polymerase and 3'-5'-exonuclease sites of DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem.* 1989 Jun 25;264(18):10858-66.

**Kaiser MW, Lyamicheva N, Ma W, Miller C, Neri B, Fors L, Lyamichev VI.**

A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21387-94.

**Kamath-Loeb AS, Shen JC, Loeb LA, Fry M.**

Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3'-5' DNA exonuclease. *J Biol Chem.* 1998 Dec 18;273(51):34145-50.

**Kamath-Loeb AS, Johansson E, Burgers PM, Loeb LA.**

Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4603-8.

**Kao HI, Henricksen LA, Liu Y, Bambara RA.**

Cleavage specificity of *Saccharomyces cerevisiae* flap endonuclease 1 suggests a double-flap structure as the cellular substrate. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):14379-89.

**Karthikeyan R, Vonarx EJ, Straffon AF, Simon M, Faye G, Kunz BA.**

Evidence from mutational specificity studies that yeast DNA polymerases delta and epsilon replicate different DNA strands at an intracellular replication fork. *J Mol Biol.* 2000 Jun 2;299(2):405-19.

**Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW.**

Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11.

**Kenny MK, Lee SH, Hurwitz J.**

Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases alpha and delta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Dec;86(24):9757-61.

**Kim C, Paulus BF, Wold MS.**

Interactions of human replication protein A with oligonucleotides. Biochemistry. 1994 Nov 29;33(47):14197-206.

**Kim K, Biade S, Matsumoto Y.**

Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. J Biol Chem. 1998 Apr 10;273(15):8842-8.

**Klenow H, Overgaard-Hansen K, Patkar SA.**

Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage. Eur J Biochem. 1971 Oct 14;22(3):371-81.

**Klett RP, Cerami A, Reich E.**

Exonuclease VI, a new nuclease activity associated with *E. coli* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968 Jul;60(3):943-50.

**Klungland A, Lindahl T.**

Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement DNase IV (FEN1). EMBO J. 1997 Jun 2;16(11):3341-8.

**Ko LJ, Prives C.**

p53: puzzle and paradigm. Genes Dev. 1996 May 1;10(9):1054-72.

**Kolpashchikov DM, Ivanova TM, Boghachev VS, Nasheuer HP, Weisshart K, Favre A, Pestryakov PE, Lavrik OI.**

Synthesis of base-substituted dUTP analogues carrying a photoreactive group and their application to study human replication protein A. Bioconjug Chem. 2000 Jul-Aug;11(4):445-51

**Kolpashchikov DM, Khodyreva SN, Khlimankov DY, Wold MS, Favre A, Lavrik OI.**

Polarity of human replication protein A binding to DNA. Nucleic Acids Res. 2001 Jan 15;29(2):373-9.

**Kornberg A, Baker TA.**

DNA replication. 2nd ed., 1992; Freeman WH and Company, New York.

**Kramer B, Kramer W, Fritz HJ.**

Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. Cell. 1984 Oct;38(3):879-87.

**Kramer B, Kramer W, Williamson MS, Fogel S.**

Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS genes. Mol Cell Biol. 1989 Oct;9(10):4432-40.

**Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T.**

Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6662-70.

**Kuchta RD, Benkovic P, Benkovic SJ.**

Kinetic mechanism whereby DNA polymerase I (Klenow) replicates DNA with high fidelity. Biochemistry. 1988 Sep 6;27(18):6716-25.

**Kühn C, Müller F, Melle C, Nasheuer HP, Janus F, Deppert W, Grosse F.**

Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. Oncogene. 1999 Jan 21;18(3):769-74.

**Kunkel TA.**

Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro*. J Biol Chem. 1986 Oct 15;261(29):13581-7.

**Kunkel TA, Alexander PS.**

The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. J Biol Chem. 1986 Jan 5;261(1):160-6.

**Kunkel TA.**

Exonucleolytic proofreading. Cell. 1988 Jun 17;53(6):837-40.

**Kunkel TA, Soni A.**

Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase-gamma. J Biol Chem. 1988 Mar 25;263(9):4450-9.

**Kunkel TA, Hamatake RK, Motto-Fox J, Fitzgerald MP, Sugino A.**

Fidelity of DNA polymerase I and the DNA polymerase I-DNA primase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 1989 Oct;9(10):4447-58.

**Kunkel TA, Roberts JD, Sugino A.**

The fidelity of DNA synthesis by the catalytic subunit of yeast DNA polymerase alpha alone and with accessory proteins. Mutat Res. 1991 Sep-Oct;250(1-2):175-82.

**Kunkel TA, Patel SS, Johnson KA.**

Error-prone replication of repeated DNA sequences by T7 DNA polymerase in the absence of its processivity subunit. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):6830-4.

**Kunkel TA.**

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 Mar;15(3):93-4.

**Kunkel TA, Bebenek K.**

DNA replication fidelity. Annu Rev Biochem. 2000;69:497-529.

**Laemmli UK.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

**Lane DP.**

Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

**Lebedeva NA, Khodyreva SN, Favre A, Lavrik OI.**

AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'-5'-exonuclease activity. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 3;300(1):182-7.

**Lebel M, Spillare EA, Harris CC, Leder P.**

The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. J Biol Chem. 1999 Dec 31;274(53):37795-9.

**Lebel M, Lavoie J, Gaudreault I, Bronsard M, Drouin R.**

Genetic Cooperation between the Werner Syndrome Protein and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 in Preventing Chromatid Breaks, Complex Chromosomal Rearrangements, and Cancer in Mice. Am J Pathol. 2003 May;162(5):1559-69.

**Lechner RL, Richardson CC.**

A preformed, topologically stable replication fork. Characterization of leading strand DNA synthesis catalyzed by T7 DNA polymerase and T7 gene 4 protein. J Biol Chem. 1983 Sep 25;258(18):11185-96.

**Lee BI, Wilson DM.**

The RAD2 domain of human exonuclease 1 exhibits 5'-3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. *J Biol Chem.* 1999 Dec 31;274(53):37763-9.

**Lee KH, Kim DW, Bae SH, Kim JA, Ryu GH, Kwon YN, Kim KA, Koo HS, Seo YS.**

The endonuclease activity of the yeast Dna2 enzyme is essential *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 2000 Aug 1;28(15):2873-81.

**Lee MY, Jiang YQ, Zhang SJ, Toomey NL.**

Characterization of human DNA polymerase delta and its immunochemical relationships with DNA polymerase alpha and epsilon. *J Biol Chem.* 1991 Feb 5;266(4):2423-9.

**Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J.**

p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1013-20.

**Lee S, Cavallo L, Griffith J.**

Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7532-9.

**Levin DS, Bai W, Yao N, O'Donnell M, Tomkinson AE.**

An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 25;94(24):12863-8.

**Li B, Comai L.**

Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *J Biol Chem.* 2000 Sep 15;275(37):28349-52.

**Li B, Comai L.**

Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):9896-902.

**Li R, Botchan MR.**

The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate *in vitro* BPV-1 DNA replication. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1207-21.

**Li X, Li J, Harrington J, Lieber MR, Burgers PM.**

Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1995 Sep 22;270(38):22109-12.

**Lieber MR.**

The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays.* 1997 Mar;19(3):233-40.

**Lilling G, Elena N, Sidi Y, Bakhanashvili M.**

p53-associated 3'-5' exonuclease activity in nuclear and cytoplasmic compartments of cells. *Oncogene.* 2003 Jan 16;22(2):233-45.

**Lindahl T.**

Excision of pyrimidine dimers from ultraviolet-irradiated DNA by exonucleases from mammalian cells. *Eur J Biochem.* 1971 Feb 1;18(3):407-14.

**Lindahl T.**

Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993 Apr 22;362(6422):709-15.

**Liu L, Mo J, Rodriguez-Belmonte EM, Lee MY.**

Identification of a fourth subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem.* 2000 Jun 23;275(25):18739-44.

**Loeb LA, Springgate CF, Battula N.**

Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.* 1974 Sep;34(9):2311-21.

**Loeb LA, Kunkel TA.**

Fidelity of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* 1982;51:429-57.

**Loeb LA.**

Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3075-9.

**Loeb LA.**

Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res.* 1998;72:25-56.

**Loeb LA.**

A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3230-9.

**Ludwig DL, MacInnes MA, Takiguchi Y, Purtymun PE, Henrie M, Flannery M, Meneses J, Pedersen RA, Chen DJ.**

A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat Res.* 1998 Oct 21;409(1):17-29.

**Lundquist RC, Olivera BM.**

Transient generation of displaced single-stranded DNA during nick translation. *Cell.* 1982 Nov;31(1):53-60.

**Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE.**

Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science.* 1993 May 7;260(5109):778-83.

**Machwe A, Ganunis R, Bohr VA, Orren DK.**

Selective blockage of the 3'-5' exonuclease activity of WRN protein by certain oxidative modifications and bulky lesions in DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jul 15;28(14):2762-70.

**Maga G, Stucki M, Spadari S, Hübscher U.**

DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol.* 2000 Jan 28;295(4):791-801.

**Maga G, Frouin I, Spadari S, Hübscher U.**

Replication protein A as a "fidelity clamp" for DNA polymerase alpha. *J Biol Chem.* 2001a May 25;276(21):18235-42.

**Maga G, Villani G, Tillement V, Stucki M, Locatelli GA, Frouin I, Spadari S, Hübscher U.**

Okazaki fragment processing: modulation of the strand displacement activity of DNA polymerase delta by the concerted action of replication protein A, proliferating cell nuclear antigen, and flap endonuclease-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001b Dec 4;98(25):14298-303.

**Mandel M, Higa A.**

Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 1970 Oct 14;53(1):159-62.

**Martin GM, Oshima J, Gray MD, Poot M.**

What geriatricians should know about the Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 1999 Sep;47(9):1136-44.

**Matsuda T, Vande Berg BJ, Bebenek K, Osheroff WP, Wilson SH, Kunkel TA.**

The base substitution fidelity of DNA polymerase beta-dependent single-nucleotide base excision repair. *J Biol Chem.* 2003 May 6 [epub ahead of print]

**Matsumoto Y, Kim K.**

Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science.* 1995 Aug 4;269(5224):699-702.

**Matsumoto Y, Kim K, Hurwitz J, Gary R, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS.**

Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem.* 1999 Nov 19;274(47):33703-8.

**May P, May E.**

Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36.

**Mazur DJ, Perrino FW.**

Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'-5' exonucleases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19655-60.

**Mazur DJ, Perrino FW.**

Excision of 3' termini by the Trex1 and TREX2 3'-5' exonucleases. Characterization of the recombinant proteins. *J Biol Chem.* 2001 May 18;276(20):17022-9.

**Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN.**

Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene.* 1997 Apr 17;14(15):1847-57.

**Melle C, Nasheuer HP.**

Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res.* 2002 Apr 1;30(7):1493-9.

**Mendelman LV, Petruska J, Goodman MF.**

Base mispair extension kinetics. Comparison of DNA polymerase alpha and reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 1990 Feb 5;265(4):2338-46.

**Mian IS.**

Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 15;25(16):3187-95.

**Mikhailov VS, Androsova IM.**

Effect of spermine on interaction of DNA polymerase alpha from the loach (*Misgurnus fossilis*) eggs with DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1984 Oct 5;783(1):6-14.

**Miller SD, Moses K, Jayaraman L, Prives C.**

Complex formation between p53 and replication protein A inhibits the sequence-specific DNA binding of p53 and is regulated by single-stranded DNA. *Mol Cell Biol.* 1997 Apr;17(4):2194-201.

**Mitra S, Boldogh I, Izumi T, Hazra TK.**

Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen.* 2001;38(2-3):180-90.

**Mitsis PG, Kowalczykowski SC, Lehman IR.**

A single-stranded DNA binding protein from *Drosophila melanogaster*: characterization of the heterotrimeric protein and its interaction with single-stranded DNA. *Biochemistry.* 1993 May 18;32(19):5257-66.

**Mizuno T, Yamagishi K, Miyazawa H, Hanaoka F.**

Molecular architecture of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex. *Mol Cell Biol.* 1999 Nov;19(11):7886-96.

**Modrich P.**

Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science.* 1994 Dec 23;266(5193):1959-60.

**Mol CD, Hosfield DJ, Tainer JA.**

Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res.* 2000 Aug 30;460(3-4):211-29.



**Morley AA.**

The somatic mutation theory of ageing. *Mutat Res.* 1995 Oct;338(1-6):19-23.

**Morrison A, Bell JB, Kunkel TA, Sugino A.**

Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'-5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9473-7.

**Morrison A, Sugino A.**

Roles of POL3, POL2 and PMS1 genes in maintaining accurate DNA replication. *Chromosoma.* 1992;102(1 Suppl):S147-9.

**Morrison A, Johnson AL, Johnston LH, Sugino A.**

Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1993 Apr;12(4):1467-73.

**Morrison A, Sugino A.**

The 3'-5' exonucleases of both DNA polymerases delta and epsilon participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 1994 Feb;242(3):289-96.

**Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS.**

The proofreading domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15;25(24):5110-8.

**Mummenbrauer T, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F.**

p53 Protein exhibits 3'-5' exonuclease activity. *Cell.* 1996 Jun 28;85(7):1089-99.

**Munn MM, Alberts BM.**

The T4 DNA polymerase accessory proteins form an ATP-dependent complex on a primer-template junction. *J Biol Chem.* 1991a Oct 25;266(30):20024-33.

**Munn MM, Alberts BM.**

DNA footprinting studies of the complex formed by the T4 DNA polymerase holoenzyme at a primer-template junction. *J Biol Chem.* 1991b Oct 25;266(30):20034-44.

**Murakami Y, Hurwitz J.**

Functional interactions between SV40 T antigen and other replication proteins at the replication fork. *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):11008-17.

**Murante RS, Huang L, Turchi JJ, Bambara RA.**

The calf 5'-3'-exonuclease is also an endonuclease with both activities dependent on primers annealed upstream of the point of cleavage. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):1191-6.

**Murante RS, Henricksen LA, Bambara RA.**

Junction ribonuclease: an activity in Okazaki fragment processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2244-9.

**Mushegian AR, Bassett DE Jr, Boguski MS, Bork P, Koonin EV.**

Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5831-6.

**Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA.**

Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.* 1998 Jan 15;58(2):222-5.

**Nasheuer HP, von Winkler D, Schneider C, Dornreiter I, Gilbert I, Fanning E.**

Purification and functional characterization of bovine RP-A in an *in vitro* SV40 DNA replication system. *Chromosoma.* 1992;102(1 Suppl):S52-9.

**Nelson WG, Kastan MB.**

DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):1815-23.

**Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W.**

Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell.* 2003 Jan 10;112(1):29-40.

**Nilsen H, Krokan HE.**

Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis.* 2001 Jul;22(7):987-98.

**Nolan JP, Shen B, Park MS, Sklar LA.**

Kinetic analysis of human flap endonuclease-1 by flow cytometry. *Biochemistry.* 1996 Sep 10;35(36):11668-76.

**Nordstrom B, Randahl H, Slaby I, Holmgren A.**

Characterization of bacteriophage T7 DNA polymerase purified to homogeneity by antithioredoxin immunoabsorbent chromatography. *J Biol Chem.* 1981 Mar 25;256(6):3112-7.

**Oda N, Saxena JK, Jenkins TM, Prasad R, Wilson SH, Ackerman EJ.**

DNA polymerases alpha and beta are required for DNA repair in an efficient nuclear extract from *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7;271(23):13816-20.

**Offer H, Wolkowicz R, Matas D, Blumenstein S, Livneh Z, Rotter V.**

Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett.* 1999 May 7;450(3):197-204.

**Offer H, Zurer I, Banfalvi G, Reha'k M, Falcovitz A, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V.**

p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res.* 2001a Jan 1;61(1):88-96.

**Offer H, Milyavsky M, Erez N, Matas D, Zurer I, Harris CC, Rotter V.**

Structural and functional involvement of p53 in BER *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* 2001b Feb 1;20(5):581-9.

**Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V.**

The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis.* 2002 Jun;23(6):1025-32.

**Opresko PL, Laine JP, Brosh RM Jr, Seidman MM, Bohr VA.**

Coordinate action of the helicase and 3'-5' exonuclease of Werner syndrome protein. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44677-87

**Orren DK, Machwe A, Karmakar P, Piotrowski J, Cooper MP, Bohr VA.**

A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):1926-1934.

**Osheroff WP, Jung HK, Beard WA, Wilson SH, Kunkel TA.**

The fidelity of DNA polymerase beta during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3642-50.

**Ottiger HP, Hübscher U.**

Mammalian DNA polymerase alpha holoenzymes with possible functions at the leading and lagging strand of the replication fork. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jul;81(13):3993-7.

**Parikh SS, Mol CD, Tainer JA.**

Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway. *Structure.* 1997 Dec 15;5(12):1543-50.

**Parikh SS, Mol CD, Hosfield DJ, Tainer JA.**

Envisioning the molecular choreography of DNA base excision repair. *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Feb;9(1):37-47.

**Parker AE, Van de Weyer I, Laus MC, Oostveen I, Yon J, Verhasselt P, Luyten WH.**

A human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* rad1+ checkpoint gene encodes an exonuclease. *J Biol Chem.* 1998 Jul 17;273(29):18332-9.

**Pascucci B, Stucki M, Jonsson ZO, Dogliotti E, Hubscher U.**

Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem.* 1999 Nov 19;274(47):33696-702.

**Pauli TT, Gellert M.**

A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6409-14.

**Perrino FW, Loeb LA.**

Proofreading by the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III increases the fidelity of calf thymus DNA polymerase alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May;86(9):3085-8.

**Perrino FW, Loeb LA.**

Hydrolysis of 3'-terminal mismatches *in vitro* by the 3'-5' exonuclease of DNA polymerase delta permits subsequent extension by DNA polymerase alpha. *Biochemistry.* 1990 Jun 5;29(22):5226-31.

**Podlutzky AJ, Dianova II, Podust VN, Bohr VA, Dianov GL.**

Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J.* 2001a Mar 15;20(6):1477-82.

**Podlutzky AJ, Dianova II, Wilson SH, Bohr VA, Dianov GL.**

DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry.* 2001b Jan 23;40(3):809-13.

**Podust VN, Podust LM, Muller F, Hübscher U.**

DNA polymerase delta holoenzyme: action on single-stranded DNA and on double-stranded DNA in the presence of replicative DNA helicases. *Biochemistry.* 1995 Apr 18;34(15):5003-10.

**Prasad R, Singhal RK, Srivastava DK, Molina JT, Tomkinson AE, Wilson SH.**

Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem.* 1996 Jul 5;271(27):16000-7.

**Prasad R, Beard WA, Strauss PR, Wilson SH.**

Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):15263-70.

**Prasad R, Dianov GL, Bohr VA, Wilson SH.**

FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):4460-6.

**Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B.**

The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature.* 1987 Apr 2-8;326(6112):471-5.

**Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA.**

Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 1988 Nov 25;242(4882):1168-71.

**Prives C, Manley JL.**

Why is p53 acetylated? *Cell.* 2001 Dec 28;107(7):815-8.

**Qiu J, Qian Y, Chen V, Guan MX, Shen B.**

Human exonuclease 1 functionally complements its yeast homologues in DNA recombination, RNA primer removal, and mutation avoidance. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):17893-900.

**Qiu J, Li X, Frank G, Shen B.**

Cell cycle-dependent and DNA damage-inducible nuclear localization of FEN-1 nuclease is consistent with its dual functions in DNA replication and repair. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):4901-8.

**Ranalli TA, Tom S, Bambara RA.**

AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41715-24.

**Randahl H, Elliott GC, Linn S.**

DNA-repair reactions by purified HeLa DNA polymerases and exonucleases. *J Biol Chem.* 1988 Sep 5;263(25):12228-34.

**Reagan MS, Pittenger C, Siede W, Friedberg EC.**

Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the RAD27 gene, a structural homolog of the RAD2 nucleotide excision repair gene. *J Bacteriol.* 1995 Jan;177(2):364-71.

**Reckmann B, Grosse F, Krauss G.**

The elongation of mismatched primers by DNA polymerase alpha from calf thymus. *Nucleic Acids Res.* 1983 Oct 25;11(20):7251-60.

**Reckmann B, Grosse F, Urbanke C, Frank R, Blocker H, Krauss G.**

Analysis of secondary structures in M13mp8 (+) single-stranded DNA by the pausing of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem.* 1985 Nov 4;152(3):633-43.

**Reddy MK, Weitzel SE, von Hippel PH.**

Processive proofreading is intrinsic to T4 DNA polymerase. *J Biol Chem.* 1992 Jul 15;267(20):14157-66.

**Riva F, Zuco V, Vink AA, Supino R, Prospero E.**

UV-induced DNA incision and proliferating cell nuclear antigen recruitment to repair sites occur independently of p53-replication protein A interaction in p53 wild type and mutant ovarian carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2001 Dec;22(12):1971-8.

**Roberts JD, Kunkel TA.**

Fidelity of a human cell DNA replication complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Oct;85(19):7064-8.

**Roberts JD, Hamatake RK, Fitzgerald MS, Sugino A, Kunkel TA.**

Effect of accessory proteins on the fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative polymerases. *Prog Clin Biol Res.* 1990;340A:91-100.

**Roberts JD, Kunkel TA**

Fidelity of DNA replication. DePamphilis ML (Ed.), *DNA replication in eukaryotic cells*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1996, 217-247.

**Robins P, Pappin DJ, Wood RD, Lindahl T.**

Structural and functional homology between mammalian DNase IV and the 5'-nuclease domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28535-8.

**Robson CN, Milne AM, Pappin DJ, Hickson ID.**

Isolation of cDNA clones encoding an enzyme from bovine cells that repairs oxidative DNA damage in vitro: homology with bacterial repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* 1991 Mar 11;19(5):1087-92.

**Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ, Hickson ID.**

Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11;20(17):4417-21.

**Salas M, Miller JT, Leis J.**

DNA replication in eukaryotic cells. DePamphilis ML (Ed.), DNA replication in eukaryotic cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1996;131-76.

**Salk D, Au K, Hoehn H, Martin GM.**

Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. Cytogenet Cell Genet. 1981;30(2):92-107.

**Salk D.**

Werner's syndrome: a review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations. Hum Genet. 1982;62(1):1-5.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.**

Molecular cloning: a laboratory manual; 2. Edition. 1989, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY.

**Saxena JK, Hays JB, Ackerman EJ.**

Excision repair of UV-damaged plasmid DNA in *Xenopus* oocytes is mediated by DNA polymerase alpha (and/or delta). Nucleic Acids Res. 1990 Dec 25;18(24):7425-32.

**Seki S, Ikeda S, Watanabe S, Hatsushika M, Tsutsui K, Akiyama K, Zhang B.**

A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/aprimidinic endonuclease activities: purification and characterization. Biochim Biophys Acta. 1991 Aug 9;1079(1):57-64.

**Seki S, Hatsushika M, Watanabe S, Akiyama K, Nagao K, Tsutsui K.**

cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III. Biochim Biophys Acta. 1992 Jul 15;1131(3):287-99.

**Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML.**

Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence. Oncogene. 2002 Jan 24;21(5):731-7.

**Seroussi E, Lavi S.**

Replication protein A is the major single-stranded DNA binding protein detected in mammalian cell extracts by gel retardation assays and UV cross-linking of long and short single-stranded DNA molecules. J Biol Chem. 1993 Apr 5;268(10):7147-54.

**Shaked Z, Yavnilovitch M, Kalb Gilboa AJ, Kessler N, Wolkowicz R, Rotter V, Haran TE.**

DNA binding and 3'-5' exonuclease activity in the murine alternatively-spliced p53 protein. Oncogene. 2002 Aug 1;21(33):5117-26.

**Shcherbakova PV, Pavlov YI.**

3'-5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 1996 Mar;142(3):717-26.

**Shen JC, Gray MD, Oshima J, Kamath-Loeb AS, Fry M, Loeb LA.**

Werner syndrome protein. I. DNA helicase and DNA exonuclease reside on the same polypeptide. J Biol Chem. 1998a Dec 18;273(51):34139-44.

**Shen JC, Gray MD, Oshima J, Loeb LA.**

Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. Nucleic Acids Res. 1998b Jun 15;26(12):2879-85.

**Shen JC, Loeb LA.**

The Werner syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. Trends Genet. 2000 May;16(5):213-20.

**Shevelev IV, Belyakova NV, Kravetskaya TP, Krutyakov VM.**

Autonomous 3'-5' exonucleases can proofread for DNA polymerase beta from rat liver. *Mutat Res.* 2000 Apr 28;459(3):237-42.

**Shevelev IV, Ramadan K, Hübscher U.**

The TREX2 3'-5' exonuclease physically interacts with DNA Polymerase  $\delta$  and increases its accuracy. *The Scientific World Journal* 2002; 2, 275-81.

**Shevelev IV, Hübscher U.**

The 3'-5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):364-76.

**Shibata Y, Nakamura T.**

Defective flap endonuclease 1 activity in mammalian cells is associated with impaired DNA repair and prolonged S phase delay. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):746-54.

**Siegal G, Turchi JJ, Myers TW, Bambara RA.**

A 5'-3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 15;89(20):9377-81.

**Simon M, Giot L, Faye G.**

The 3'-5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *EMBO J.* 1991 Aug;10(8):2165-70.

**Singhal RK, Wilson SH.**

Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem.* 1993 Jul 25;268(21):15906-11.

**Sinsheimer RL.**

Purification and properties of bacteriophage  $\phi$ X174. *Mol. Biol.* 1959 1:37-42.

**Skalski V, Lin ZY, Choi BY, Brown KR.**

Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene.* 2000a Jul 6;19(29):3321-9.

**Skalski V, Brown KR, Choi BY, Lin ZY, Chen S.**

A 3'-5' exonuclease in human leukemia cells: implications for resistance to 1-beta -D-arabino-furanosylcytosine and 9-beta -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 2000b Aug 18;275(33):25814-9.

**Søe K, Hartmann H, Schlott B, Stevnsner T, Grosse F.**

The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex *in vitro*. *Oncogene.* 2002 Sep 26;21(43):6614-23.

**Sommers CH, Miller EJ, Dujon B, Prakash S, Prakash L.**

Conditional lethality of null mutations in RTH1 that encodes the yeast counterpart of a mammalian 5'-3' exonuclease required for lagging strand DNA synthesis in reconstituted systems. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4193-6.

**Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B.**

Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer.* 1994 Apr 1;57(1):1-9.

**Spillare EA, Robles AI, Wang XW, Shen JC, Yu CE, Schellenberg GD, Harris CC.**

p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes Dev.* 1999 Jun 1;13(11):1355-60.

**Stephan H, Grosse F, Søe K.**

Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by a p53-stimulated recombination-like reaction *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 2002 Dec 1;30(23):5087-93.

**Stürzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S.**

p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 1996 Apr 15;15(8):1992-2002.

**Sun X, Wu P, Zheng L, Thrower D, Partikian A, Qiu J, Shen B.**

Suppression of *Saccharomyces cerevisiae* rad27 null mutant phenotypes by the 5' nuclease domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Curr Genet.* 2002 Sep;41(6):379-88.

**Süße S, Janz C, Janus F, Deppert W, Wiesmüller L.**

Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene.* 2000 Sep 14;19(39):4500-12.

**Suzuki N, Shimamoto A, Imamura O, Kuromitsu J, Kitao S, Goto M, Furuichi Y.**

DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 1;25(15):2973-8.

**Suzuki N, Shiratori M, Goto M, Furuichi Y.**

Werner syndrome helicase contains a 5'-3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jun 1;27(11):2361-8.

**Szekely AM, Chen YH, Zhang C, Oshima J, Weissman SM.**

Werner protein recruits DNA polymerase delta to the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11365-70.

**Tabor S, Huber HE, Richardson CC.**

*Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *J Biol Chem.* 1987 Nov 25;262(33):16212-23.

**Tabor S, Richardson CC.**

Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by *in vitro* mutagenesis. *J Biol Chem.* 1989 Apr 15;264(11):6447-58.

**Tanabe K, Bohn EW, Wilson SH.**

Steady-state kinetics of mouse DNA polymerase beta. *Biochemistry.* 1979 Jul 24;18(15):3401-6.

**Tchang F, Mechali M.**

Nuclear import of p53 during *Xenopus laevis* early development in relation to DNA replication and DNA repair. *Exp Cell Res.* 1999 Aug 25;251(1):46-56.

**Therrien JP, Drouin R, Baril C, Drobetsky EA.**

Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):15038-43.

**Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA.**

The 3'-5' exonucleases of DNA polymerases delta and epsilon and the 5'-3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2000-7.

**Treuner K, Ramsperger U, Knippers R.**

Replication protein A induces the unwinding of long double-stranded DNA regions. *J Mol Biol.* 1996 May 31;259(1):104-12.

**Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P.**

Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21447-50.

**Tsurimoto T, Stillman B.**

Replication factors required for SV40 DNA replication *in vitro*. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. J Biol Chem. 1991 Jan 25;266(3):1950-60.

**Tsurimoto T.**

PCNA binding proteins. Front Biosci. 1999 Dec 1;4:D849-58.

**Vanderstraeten S, Van den Brule S, Hu J, Foury F.**

The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. J Biol Chem. 1998 Sep 11;273(37):23690-7.

**Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A.**

A p53-Dependent Checkpoint Pathway Prevents Rereplication. Mol Cell. 2003 Apr;11(4):997-1008.

**Vogelstein B, Kinzler KW.**

p53 function and dysfunction. Cell. 1992 Aug 21;70(4):523-6.

**Waga S, Bauer G, Stillman B.**

Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. J Biol Chem. 1994 Apr 8;269(14):10923-34.

**Waga S, Stillman B.**

The DNA replication fork in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem. 1998;67:721-51.

**Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K.**

Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucleic Acids Res. 1979 Aug 10;6(11):3543-57.

**Wang Q, Zhu Q, Wani MA, Wani G, Chen J, Wani AA.**

Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. DNA Repair (Amst). 2003 May 13;2(5):483-99.

**Wang TS, Korn D.**

Reactivity of KB cell deoxyribonucleic acid polymerases alpha and beta with nicked and gapped deoxyribonucleic acid. Biochemistry. 1980 Apr 29;19(9):1782-90.

**Wang TS**

DNA replication in eukaryotic cells. DePamphilis ML ed. 1996;461-93

**Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, et al.**

p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. Nat Genet. 1995 Jun;10(2):188-95.

**Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers JH, Harris CC.**

The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. Genes Dev. 1996 May 15;10(10):1219-32.

**Warbrick E.**

The puzzle of PCNA's many partners. Bioessays. 2000 Nov;22(11):997-1006.

**Watson JD, Crick FH.**

Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953, 171:737-38; 964-67



**Weber J, Grosse F.**

Fidelity of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase in copying natural DNA. *Nucleic Acids Res.* 1989 Feb 25;17(4):1379-93.

**Weymouth LA, Loeb LA.**

Mutagenesis during *in vitro* DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Apr;75(4):1924-8.

**Wiesmüller L, Cammenga J, Deppert WW.**

*In vivo* assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol.* 1996 Feb;70(2):737-44.

**Wilcock D, Lane DP.**

Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature.* 1991 Jan 31;349(6308):429-31.

**Wilson SH, Kunkel TA.**

Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol.* 2000 Mar;7(3):176-8.

**Wold MS, Weinberg DH, Virshup DM, Li JJ, Kelly TJ.**

Identification of cellular proteins required for simian virus 40 DNA replication. *J Biol Chem.* 1989 Feb 15;264(5):2801-9.

**Wold MS.**

Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:61-92.

**Xanthoudakis S, Curran T.**

Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 1992 Feb;11(2):653-65.

**Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T.**

The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 4;91(1):23-7.

**Xu Y, Derbyshire V, Ng K, Sun XC, Grindley ND, Joyce CM.**

Biochemical and mutational studies of the 5'-3' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1997 May 2;268(2):284-302.

**Xu Y, Grindley ND, Joyce CM.**

Coordination between the polymerase and 5'-nuclease components of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7;275(27):20949-55.

**Young MC, Reddy MK, von Hippel PH.**

Structure and function of the bacteriophage T4 DNA polymerase holoenzyme. *Biochemistry.* 1992 Sep 22;31(37):8675-90.

**Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD.**

Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science.* 1996 Apr 12;272(5259):258-62.

**Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C.**

A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):914-23.

**Zhou Y, Achanta G, Pelicano H, Gandhi V, Plunkett W, Huang P.**

Action of (E)-2'-deoxy-2'-(fluoromethylene)cytidine on DNA metabolism: incorporation, excision, and cellular response. *Mol Pharmacol.* 2002 Jan;61(1):222-9.

**Zhu FX, Biswas EE, Biswas SB.**

Purification and characterization of the DNA polymerase alpha associated exonuclease: the RTH1 gene product. *Biochemistry*. 1997 May 20;36(20):5947-54.

**Zuo S, Gibbs E, Kelman Z, Wang TS, O'Donnell M, MacNeill SA, Hurwitz J.**

DNA polymerase delta isolated from *Schizosaccharomyces pombe* contains five subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 14;94(21):11244-9.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Große für die interessante Themenstellung, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Anregungen.

Herrn Dr. H. Rüterjans danke ich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitsmethoden, seine außerordentliche Hilfsbereitschaft und die Diskussion schwieriger Fragestellungen.

Frau Dr. H. Hartmann und Herrn Dr. K. Søe danke ich für rege Anteilnahme und die fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Abteilung Biochemie für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei den Kollegen bedanken, die mir aufgereinigte Proteine oder bereits replizierte DNA zur Verfügung gestellt haben: Frau Dipl. Biochem. P. Freede, Frau Dr. H. Hartmann, Herrn PD Dr. H.-P. Nasheuer, Herrn Dr. S. Nicolaus, Herrn Dr. K. Søe und Herrn Dr. S. Zhang von der Abteilung Biochemie und Herrn Dr. J. Christensen vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie vom Panum Institut der Universität Kopenhagen. Frau A. Willitzer danke ich für die Synthese von Oligonukleotiden.

Bei den lieben Kollegen Annerose, Alex, Armin, Birgit, Caroline, Christian, Hella, Henrik, Jan, Kent, Oliver, Pavel, Richard und Ulrike möchte ich mich herzlich für unsere Donnerstage im CC bedanken.

## **Ehrenwörtliche Erklärung / Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist. Ich habe die Dissertation selbst angefertigt sowie alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Dissertation angegeben.

Ich versichere, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche Arbeit, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, 20.05.2003

Anja Mohrdieck