

Analyse und biochemische Charakterisierung der  
Protein-Komponenten eines Diversitätsgenerierenden  
Retroelements aus *Nostoc sp.* PCC 7120

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des  
akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte  
Dissertation

Vorgelegt von

Lisa Jakobi

Datum der wissenschaftlichen Aussprache

09.12.2016

Betreuerin: Frau Dr. Nora Zingler

Korreferent: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

Vorsitz: Herr Prof. Dr. John Cullum

Kaiserslautern, 2016

D 386



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	10
Zusammenfassung .....	11
Summary .....	12
1. Einleitung .....	13
1.1 Diversitätsgenerierende Retroelemente .....	15
1.1.1 Variable Region und Template Repeat .....	18
1.1.2 Das Zielprotein .....	20
1.1.3 Die reverse Transkriptase .....	21
1.1.4 Die akzessorische variable Determinante .....	23
1.2 Die DGR-Systeme aus <i>Nostoc</i> .....	25
1.3 Zielsetzung .....	26
2. Material & Methoden .....	28
2.1 Material .....	28
2.1.1 Chemikalien .....	28
2.1.2 Lösungen und Puffer .....	29
2.1.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	29
2.1.2.2 Arbeiten mit Proteinen .....	31
2.1.3 Medien .....	40
2.1.4 Konstrukte .....	41
2.1.5 Stämme .....	42
2.1.6 Enzyme .....	42
2.1.7 Antikörper .....	43
2.1.8 Radiochemikalien .....	43

2.1.9 Größenstandards für DNA- und Proteinarbeiten .....	43
2.1.10 Kits .....	44
2.1.11 Geräte .....	44
2.1.12 Software .....	45
2.1.13 Diverses .....	45
2.2 Methoden.....	45
2.2.1 Analytische Methoden .....	45
2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese .....	45
2.2.1.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	46
2.2.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
2.2.1.4 Western Blot.....	47
2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	48
2.2.2.1 Plasmidpräparation, Fällung und Phenol-Chloroform-Extraktion.....	48
2.2.2.2 Plasmid-Transformation in <i>E. coli</i> .....	49
2.2.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	49
2.2.2.4 Fluorometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	50
2.2.2.5 Spektrometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	50
2.2.2.6 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden.....	50
2.2.2.7 Herstellung von Nukleinsäure-Duplices .....	51
2.2.2.8 in vitro Transkription .....	51
2.2.2.9 Ortsspezifische Mutagenese .....	52
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	52
2.2.3.1 Überexpression rekombinanter Proteine und Zelllyse .....	52
2.2.3.2 Proteinaufreinigung und Dialyse .....	54
2.2.3.3 Fluorometrische Quantifizierung von Proteinen.....	57
2.2.4 Methoden zur Charakterisierung der RT <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 .....	57

2.2.4.1	Aktivitätsassay der RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 .....	57
2.2.4.2	RT-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	58
2.2.3	Methoden zur Charakterisierung der nAvd <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120.....	59
2.2.3.1	Filter-Binding-Assay (FBA) .....	59
2.2.3.2	Hybridisierungsassays .....	59
2.2.3.3	Strangaustauschassay .....	60
2.2.3.3	Protein-Stabilitätsassay .....	60
2.2.3.4	DNA-Stabilitätsassay.....	60
3.	Ergebnisse .....	61
3.1	Untersuchung der reversen Transkriptase.....	61
3.1.1	Ortsspezifische Mutagenese der RTs aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 und <i>Bordetella</i> -Phage zur Erhöhung der Stabilität .....	61
3.1.2	Die rekombinante Überexpression und Aufreinigung der RTs erwiesen sich als problematisch.....	62
3.1.2.1	Optimierung der Überexpression und der Zellyse .....	62
3.1.2.2	Überexpression der RTs aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 und <i>Thermus aquaticus</i> .....	64
3.1.2.3	Aufreinigung der RTs aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 und <i>Thermus aquaticus</i> .....	65
3.1.3	Die RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 ist <i>in vitro</i> unlöslich und fällt bei Lagerung aus.....	70
3.1.4	Aktivitätsanalysen der RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120.....	72
3.1.4.1	Erste Hinweise auf eine nRT-Aktivität .....	73
3.1.4.2	Verdau der radioaktiv markierten RT-Assayprodukte zur Analyse der Nukleinsäuren	77
3.1.4.3	Weiterführende Untersuchungen der nRT-Aktivität mit anschließender Sequenzanalyse .....	79
3.1.5	Zusammenfassung der RT-Ergebnisse.....	81
3.2	Untersuchung der akzessorischen variablen Determinante aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120.....	81
3.2.1	Rekombinante Überexpression und Aufreinigung der nAvd .....	82
3.2.2	Das Bindungsverhalten verschiedener Nukleinsäuren durch die nAvd .....	83

3.2.3 Hybridisierung diverser Nukleinsäuren durch die nAvd.....	87
3.2.3.1 Analyse der AT-reichen Substraten NZ116 und NZ117 .....	88
3.2.3.2 Analyse der Substrate NZ50 und NZ51 zur Untersuchung der Auswirkung des GC-Gehaltes.....	90
3.2.3.3 Analyse der AT-reichen Substrate TS81 und TS82 zur Untersuchung der Auswertung der Substratlänge .....	92
3.2.3.4 Analyse zur Auswirkung der Hybridisierungsaktivität der nAvd auf sehr lange Substrate sowie auf RNA/DNA-Hybridisierung.....	93
3.2.4 Eine Strangaustauschaktivität der nAvd konnte nicht nachgewiesen werden .....	96
3.2.5 Die nAvd weist eine hohe Thermostabilität auf.....	98
3.2.6 Die nAvd ist in der Lage die Schmelztemperatur von doppelsträngigen Nukleinsäuren zu erhöhen.....	102
3.2.7 Zusammenfassung der analysierten Eigenschaften der nAvd .....	105
4. Diskussion.....	106
4.1 Die reverse Transkriptase Alr3497 aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 DGR.....	108
4.1.1 Die RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 erweist sich als höchst sensibel .....	108
4.1.1.1 Die Aufreinigung der nRT erfordert weitere Optimierungen.....	109
4.1.1.2 Die Stabilität der nRT erweist sich weiterhin als problematisch.....	110
4.1.2 Erste Hinweise auf eine RT-Aktivität aus dem <i>Nostoc sp</i> PCC 7120 DGR.....	111
4.2 Das akzessorische Protein Alr3496 aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 DGR .....	113
4.2.1 Potentielle Mechanismen für die Retrotransposition von DGRs .....	113
4.2.2 Die nAvd bindet verschiedene Nukleinsäuren mit unterschiedlicher Affinität.....	115
4.2.3 Die nAvd katalysiert die Hybridisierung von Nukleinsäuren .....	117
4.2.4 Die nAvd weist keine Strangaustauschaktivität auf .....	119
4.2.5 Die nAvd ist selbst thermostabil und stabilisiert Nukleinsäuren unter Hitzestress .....	120
4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse des akzessorischen Proteins Alr3496 aus <i>Nostoc sp.</i> PCC7120.....	121
4.3 Interaktion zwischen RT und Avd .....	122

4.4 Biologische Funktionen des <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 DGR-Systems .....	123
4.5 Abschließender Kommentar.....	124
5. Literaturverzeichnis.....	126
Abkürzungsverzeichnis .....	138
Anhang .....	143
I. Vektorkarten .....	143
II. Zu den Versuchen der reversen Transkriptase.....	150
II.I Vergleich der RT-Wildtypsequenzen aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 sowie dem <i>Bordetella</i> -Phagen mit den Mutanten D135Q (pKH3) bzw. D138Q (pKH4).....	150
II.II Expressionsvergleich der nRT in verschiedenen Zellen.....	151
II.III Dialysepuffer .....	151
II.IV Sequenzen von pKH2 und pNZ004 zur Herstellung der RNA-Matrizen der RT-Assays.....	152
III. Zu den Versuchen des akzessorischen Proteins.....	153
III.I Übersicht über Eigenschaften der Oligosubstrate .....	153
III.II Bindungsstudien der nAvd .....	156
III.III Hybridisierungsversuche der nAvd.....	157
Danksagung .....	159
Lebenslauf .....	160
Eidesstattliche Versicherung .....	161

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch dargestellte DGR-Kassette des <i>Bordetella-Phagen</i> . .....	16
Abbildung 2: Hypothetischer DGR-Mechanismus.....	17
Abbildung 3: Pentamere Fassstruktur der Avd .....	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung der DGR-Systeme in <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120.....	26
Abbildung 5: Beispielhafte Überexpression der RTs aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, <i>Thermus aquaticus (Taq)</i> und M-MLV .....	65
Abbildung 6: RTs aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, <i>Thermus aquaticus (Taq)</i> , welche an einen His-Tag fusioniert sind, binden nicht an Nickelmatrix.....	67
Abbildung 7: Eine effiziente Aufreinigung der RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, welche an einen His-Tag fusioniert ist, war über Heparin-Agarose nicht möglich.....	68
Abbildung 8: Die RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 konnte durch denaturierende Zelllyse und Aufreinigung mittels Urea nicht aufgereinigt werden.....	69
Abbildung 9: Eine Rückfaltung der nRT nach denaturierender Aufreinigung ist nicht möglich .....	70
Abbildung 10: Die Stabilität der RT aus <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 nimmt mit zunehmender Lagerdauer ab.....	71
Abbildung 11: Vergleich der Stabilität der nRT (pKH3) in verschiedenen Dialysepuffern .....	72
Abbildung 12: Zusammenfassung der 25 analysierten radioaktiv markierten RT-Assays .....	74
Abbildung 13: Vergleich 5 verschiedener RT-Assays, welche parallel von zwei Personen durchgeführt wurden .....	76
Abbildung 14: Analytischer Verdau der während der RT-Assays generierten Nukleinsäuren.....	78
Abbildung 15: RT-PCR im Anschluss an einen RT-Assay.....	80
Abbildung 16: Überexpression, Aufreinigung und Dialyse der nAvd .....	82
Abbildung 17: Getestete Nukleinsäuresubstrate zur Analyse des Bindungsverhaltens der nAvd.....	84
Abbildung 18: Beispielhaftes Ergebnis eines Filter-Binding-Assays mit dem RNA/DNA-Hybrid pLM1-RNA und TS77* .....	85
Abbildung 19: Auswertung der Filter-Binding-Assays mit steigender nAvd-Konzentration .....	86
Abbildung 20: Hybridisierungsassay mit den Substraten NZ116* und NZ117.....	88

Abbildung 21: Auswertung der Hybridisierungsassays mit NZ116* und NZ117 .....	90
Abbildung 22: Auswertung der Hybridisierungsassays mit NZ50* und NZ51 .....	91
Abbildung 23: Auswertung der Hybridisierungsassays mit TS81* und TS82 .....	93
Abbildung 24: Auswertung der Hybridisierungsassays mit TS75* und TS76 .....	94
Abbildung 25: Auswertung der Hybridisierungsassays von TR-RNA (pLM1) und TS76* .....	95
Abbildung 26: Über das Programm MFold errechnete Sekundärstruktur von TS75 .....	96
Abbildung 27: Schematischer Versuchsaufbau der Strangaustauschversuche .....	97
Abbildung 28: Ergebnis eines nAvd-Stabilitätstests nach Inkubation der nAvd bei 0 °C und 35 °C- 95 °C in 5 °C Schritten .....	99
Abbildung 29: Protein-Stabilitätsanalyse mittels eines Nukleinsäurechaperonassays mit NZ116* und NZ117 nach Inkubation der nAvd bei 0 °C und 35 °C- 95 °C .....	100
Abbildung 30: Auswertung der Protein-Stabilitätsassays nach Erhitzen der nAvd von 35 °C- 95 °C in 5 °C Schritten sowie nicht erhitzt (0 °C) .....	101
Abbildung 31: DNA-Stabilitätsassay mit den ds-Substraten NZ116*: NZ117 .....	103
Abbildung 32: Auswertung der DNA-Stabilitätsassays .....	104
Abbildung 33: Vier potentielle Mechanismen für die Retrotransposition von DGRs nach Medhekar und Miller, 2007 .....	114
Abbildung 34: Vergleich der Expression der <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 RT von pKH3 in verschiedenen Zellen .....	151
Abbildung 35: Hybridisierungsassay mit NZ50* und NZ51. ....	157
Abbildung 36: Hybridisierungsassay mit TS81* und TS82 .....	157
Abbildung 37: Hybridisierungsassay mit TS75* und TS76 .....	158
Abbildung 38: Hybridisierungsassay mit pLM1-RNA und TS76* .....	158

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, die nicht von Appllichem GmbH bezogen wurden .....	28
Tabelle 2: Verwendete Konstrukte, Daten und Verwendungszweck.....	41
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme .....	42
Tabelle 4: Genutzte Enzyme, welche nicht von NEB bezogen wurden .....	43
Tabelle 5: Verwendete Antikörper .....	43
Tabelle 6: Verwendete Radiochemikalien.....	43
Tabelle 7: Verwendete Größenstandards und Marker .....	43
Tabelle 8: Verwendete Kits .....	44
Tabelle 9: Wichtigste Geräte .....	44
Tabelle 10: Auf SDS-Gele aufgetragene Probenvolumina.....	47
Tabelle 11: Primersequenzen für die ortsspezifische Mutagenese der bRt und nRT .....	52
Tabelle 12: Puffer, Volumina und Wiederholung der einzelnen Wasch- und Elutionsschritte für RT und nAvd.....	55
Tabelle 13: Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen der RT-PCR.....	58
Tabelle 14: Überblick zu Expression und Löslichkeit der RTs aus verschiedenen Organismen unter gleichen Expressionsbedingungen .....	64
Tabelle 15: Absolute Counts sowie Vielfaches der Werte über der Wasserkontrolle eines beispielhaften radioaktiv markierten RT-Assays. ....	73
Tabelle 16: Vergleich einer Versuchsreihe der nRT-Aktivität in zweifacher Ausführung .....	77
Tabelle 17: Errechnete Bindungsparameter der nAvd in Abhängigkeit verschiedener Substrate. ....	87
Tabelle 18: Getestete Dialysepuffer zur Stabilisierung der <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 RT.....	152
Tabelle 19: Oligosubstrate für nAvd Hybridisierungs-, Strangaustausch- und Bindungsversuche..	154
Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse aller durchgeführten FBAs .....	156

## Zusammenfassung

Diversitätsgenerierende Retroelemente (DGRs) wurden im Jahre 2002 in *Bordetella*-Phagen entdeckt und stellen eine einzigartige Klasse unter den Retroelementen dar. Durch einen speziellen „*Copy-and-Replace*“ Mechanismus sind sie in der Lage ein bestimmtes Zielgen zu hypermutieren. Bei diesem *Mutagenic Homing*-Prozess wird die RNA der Templat-Region (TR) durch die elementeigene reverse Transkriptase (RT) transkribiert. Die dabei entstandene mutierte cDNA wird anschließend in die variable Region (VR) des Zielgens inkorporiert und dieses somit diversifiziert. Hierbei steht der experimentelle Nachweis für die Hypermutation durch die RT noch aus. Zudem spielt das akzessorische Protein (Avd) eine weitere wichtige Rolle im *Mutagenic Homing* Prozess, wobei dessen tatsächliche Funktion noch nicht charakterisiert werden konnte. Bis dato gibt es vor allem Analysen in Bezug auf das *Bordetella*-Phagen DGR, womit sich die Frage nach anderen Systemen und allgemeiner Anwendbarkeit stellt. Daher war die Analyse des *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR Hauptgegenstand dieser Arbeit, wobei der Fokus auf der Untersuchung der reversen Transkriptase (nRT), sowie der Charakterisierung des akzessorischen Proteins (nAvd) aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR lag.

Die nRT konnte überexprimiert werden, wobei sie nur teilweise löslich vorlag. Eine effektive Aufreinigung der nRT konnte mit den hier getesteten Methoden nicht erzielt werden, sodass andere Aufreinigungsmethoden erprobt werden müssen. Zudem war die nRT nicht lagerfähig, wodurch eine regelmäßige neue Proteinpräparation nötig war. In Aktivitätsstudien konnten erste Hinweise auf eine Aktivität der nRT erhalten werden. Dabei konnten die entstandenen Nukleinsäuren nicht nur detektiert, sondern auch mittels analytischem Verdau als DNA identifiziert werden. Darüber hinaus konnte die synthetisierte cDNA mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend sequenziert werden. Hierbei wurden jedoch keine Adenin-spezifischen oder sonstigen Mutationen beobachtet. Somit konnte kein Nachweis für Hypermutation durch die RT erbracht werden. Bei Untersuchungen bezüglich einer möglichen Interaktion zwischen nRT und nAvd konnte keine erhöhte nRT-Aktivität durch die nAvd festgestellt werden.

Die Untersuchungen der nAvd zeigten, dass diese Nukleinsäuren bindet. Hierbei waren Präferenzen gegenüber verschiedenen Nukleinsäuren zu beobachten. Vor allem RNA/DNA-Hybride zeigt die höchste Affinität gegenüber der nAvd, während dsDNA eine höhere Affinität zur nAvd aufweist als ssRNA. Zudem ist die nAvd in der Lage Nukleinsäuren zu hybridisieren. Hierbei hybridisiert sie AT-reiche DNA-Moleküle von mittlerer Länge (48 bp) am effizientesten. Ein von der nAvd katalysierter Strangaustausch konnte nicht beobachtet werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass die nAvd selbst bis 95 °C hitzestabil ist und im Anschluss an Hitzestress weiterhin Nukleinsäuren hybridisieren kann. Darüber hinaus ist sie befähigt Nukleinsäuren unter Hitzestress zu stabilisieren. Diese Ergebnisse lassen auf eine Rolle der nAvd als Lotse oder zur Stabilisierung von Nukleinsäuren schließen.

## Summary

Diversity-generating Retroelements (DGRs) were discovered in the *Bordetella*-Phage in 2002 and represent a unique class of retroelements. Using a special „Copy-and-Replace“ mechanism, DGRs are able to hypermutate a specific target gene. During this process called Mutagenic Homing, the template region (TR) RNA is transcribed by the element encoded reverse transcriptase (RT). The generated mutated cDNA is subsequently incorporated into the variable region (VR) of the target gene, which is thereby diversified. The experimental proof that the RT is indeed responsible for the generated mutations is still missing. Furthermore, the accessory protein (Avd) plays an important role during Mutagenic Homing, but its actual function still needs to be characterized. So far, most analyses employ the *Bordetella*-Phage DGR, which raises the question how other systems may work and if a general applicability exists. Therefore, the analysis of *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR was the main subject of this work, focusing on the investigation of the reverse transcriptase (nRT) as well as on the characterization of the accessory protein (nAvd) of the *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR system.

Overexpression of nRT was successful, but resulted in a low percentage of soluble protein. An effective purification of the nRT could not be achieved by the tested purification methods, so that further methods need to be tested. Additionally, the nRT rapidly lost activity upon storage, which made frequent protein preparations necessary. Based on activity studies first evidence of enzymatic activity of the nRT was obtained. Not only was it possible to detect the generation of nucleic acids, but they could also be identified as DNA by an analytical digest. Moreover, the synthesized cDNA could be amplified by PCR and the PCR products could be subsequently sequenced. However, adenine specific or other mutations could not be observed. Thus, the proof that the RT is responsible for hypermutation of cDNA could not be provided. Investigating a possible interaction between nRT and nAvd, an increased nRT activity generated by the nAvd could not be detected.

Investigations of the nAvd protein showed binding of nucleic acids with. Differential binding to different nucleic acids. nAvd showed the highest affinity against nAvd for RNA/DNA hybrids and the lowest affinity for ssRNA, with dsDNA in an intermediate range. Furthermore, nAvd has the ability to hybridize nucleic acids. Here, AT-rich DNA molecules of a median length (48 bp) were hybridized most efficiently. A strand exchange mediated by the nAvd could not be observed. In addition, nAvd itself is thermostable up to 95 °C and is subsequently still able to catalyze the hybridization of nucleic acids. Moreover, the nAvd is capable of stabilizing nucleic acids during heat stress. These results imply that the nAvd may act as guide or stabiliser for nucleic acids.

## 1. Einleitung

Friedrich Miescher beschrieb 1869 eine neu erforschte Substanz, welche er „Nuclein“ nannte, und entdeckte damit die Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Dahm, 2005). In den folgenden Jahren wurde diese detailliert untersucht, wodurch 1943 Oswald Avery schließlich nachweisen konnte, dass es sich bei DNA um die Trägersubstanz des Erbgutes handelt (Avery et al., 1943; Hershey und Chase, 1952) und somit die immense Bedeutung dieses Moleküls darlegen. Die Doppelhelixstruktur der DNA wurde 1953 von James Watson und Francis Crick aufgeklärt (Watson und Crick, 1953), jedoch nur dank DNA-Röntgenstrukturanalysen von Rosalind Franklin. Einen weiteren Meilenstein in der Nukleinsäureforschung setzte Barbara McClintock. Schon Anfang der 1950er postulierte sie die Existenz von mobilen genetischen Elementen oder auch springenden Genen (McClintock, 1956), was zu dieser Zeit im Widerspruch zur vorherrschenden Meinung eines starren Genoms stand, sodass ihre Arbeit erst 1983 mit Nobelpreises für Medizin ausgezeichnet wurde.

Mobile genetische Elemente sind einhundert bis mehrere tausend Basenpaare (bp) lange DNA-Abschnitte, die in der Lage sind, ihre Position innerhalb eines Genoms zu verändern und dieses somit maßgeblich zu beeinflussen. Sie sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten in hoher Anzahl vertreten (Chénais et al., 2012). Früher wurde diese DNA fälschlicherweise als parasitär und selbstsüchtig interpretiert (Doolittle und Sapienza, 1980; Orgel und Crick, 1980; Temin, 1989; Volff, 2006). Heute ist hingegen bekannt, dass durch Insertionen, Deletionen, Rekombinationen, Neugruppierungen und strukturellen Organisation von Genen sowie zur Entstehung neuer Gene zur Evolution beitragen (Chénais et al., 2012; Cohen, 1976; Feschotte, 2008; Han und Boeke, 2005; Kazazian, 2004). Zudem sind sie an der epigenetischen Regulation von Wirtsgenomabschnitten beteiligt (Chueh et al., 2009). Mobile genetische Elemente werden, ausgehend von der Art ihrer Positionsänderung im Genom (Transposition), in verschiedene Gruppen unterteilt. DNA-Transposons nutzen für die Transposition einen „*Cut-and-Paste*“ Mechanismus, bei welchem die DNA-Sequenz aus dem Genom mittels einer Transposase ausgeschnitten und an einer anderen Stelle im Genom über eine Integrase integriert wird (Kazazian, 1998; Repanas et al., 2007). Retroelemente bewegen sich mittels eines „*Copy-and-Paste*“ Mechanismus durch das Wirtsgenom. Dazu wird die Sequenz in eine mobile RNA-Zwischenstufe umgeschrieben, welche über eine reverse Transkriptase (RT) wieder in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert und in das Wirtsgenom integriert wird (Kajikawa et al., 2005; Kazazian, 1998). Die hierbei nötige reverse Transkriptase ist für Retroelemente essentiell und wird von einem Großteil selbst kodiert (Eickbush und Jamburuthugoda, 2008; Mathias et al., 1991; Saigo et al., 1984). Bei diesem Prozess, der Retrotransposition, findet eine Vervielfältigung dieser Elemente statt, wobei die neue Lokation im Genom oft zufällig ist. Befindet sich diese Stelle in einer kodierenden

Sequenz, kann die Genfunktion zerstört werden, was meist negative Auswirkungen für den Wirt mit sich bringt (Kazazian, 1998; Lee et al., 2012). Selbst die Integration in der Nähe einer kodierenden Sequenz kann in höheren Eukaryoten zu Veränderungen der Genfunktion führen (Kuehnen et al., 2012), da hierbei die Transkriptionsraten der umliegenden Sequenzen durch epigenetische Modifikationen beeinflusst werden können. Nur einige wenige Elemente integrieren an spezifische Stellen im Genom, wie das ZAM Retroelement (*Drosophila melanogaster*), welches eine spezifische Konsensussequenz erkennt (Leblanc et al., 1999). Auch die stringenten R1 (*Drosophila melanogaster*) und R2 (*Bombyx mori*) Elemente integrieren spezifisch, wobei sie bevorzugt in Sequenzen springen, die für ribosomale RNAs kodieren (Jakubczak et al., 1991). Zudem integrieren TY-Retroelemente (*Saccharomyces cerevisiae*) präferiert in der Nähe von Transfer-RNA (tRNA) Genen (Hani und Feldmann, 1998). Im Gegensatz dazu können Alu-Elemente über das Genom verteilt aufgefunden werden und integrieren somit gleichmäßig (Wagstaff et al., 2012). Die meisten Elemente wie das LINE-1 (*Homo sapiens*) und Unal2 (*Anguilla japonica*) integrieren bevorzugt an AT-reichen Sequenzen, auch wenn sie durchaus bestimmte Sequenzen erkennen und favorisieren (Feng et al., 1996).

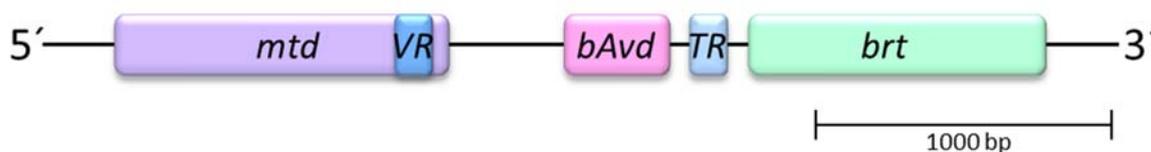
Zu der Gruppe der Retroelemente gehören die oben erwähnten LINE- und Alu-Elemente (Dombroski et al., 1994; Kazazian und Goodier, 2002) sowie Gruppe-II-Introns (Bonen und Vogel, 2001) oder auch Retrons und Retroplasmide (Chiang et al., 1994; Galligan und Kennell, 2007). Eine neu entdeckte Gruppe der Retroelemente stellen die diversitätsgenerierenden Retroelemente (DGRs) (Liu et al., 2002) dar. Sie unterscheiden sich erheblich von anderen bekannten Retroelementen, da sie in der Lage sind, ihrem Wirt einen enormen Selektionsvorteil zu verschaffen. Hierzu nutzen sie nicht den für Retroelemente typischen „Copy-and-Paste“ Mechanismus, sondern verwenden einen sogenannten „Copy-and-Replace“ Mechanismus (Guo et al., 2008). Dazu werden bestimmte Zielgene hypermutiert, wobei nur Stellen an denen sich Adenine befindet betroffen sind. Hierdurch werden unterschiedliche Proteinsequenzen erzeugt (Doulatov et al., 2004; Liu et al., 2002; Minot et al., 2012; Schillinger et al., 2012), ohne dass sich das DGR dabei vervielfältigt oder weitere Stellen im Wirtsgenom verändert.

## 1.1 Diversitätsgenerierende Retroelemente

DGRs wurden im Jahr 2002 im *Bordetella*-Phagen entdeckt (Liu et al., 2004, 2002). Der *Bordetella*-Phage ist ein 42,5 Kilobasen (kb) Doppelstrang-DNA (dsDNA) Phage, welcher *Bordetella*-Bakterien infiziert. *Bordetella*-Bakterien existieren in verschiedenen Lebensphasen, der Plus-Phase (Bvg+ Phase) und der Minus-Phase (Bvg- Phase), welche durch das BvgAS Signaltransduktionssystem reguliert werden (Akerley et al., 1995; Deora et al., 2001; Mattoo et al., 2001; Stockbauer et al., 2001; Uhl und Miller, 1996). In der Bvg+ Phase werden verschiedene Proteine, unter anderem das Oberflächenprotein Pertactin, exprimiert, jedoch nicht während der Bvg- Phase. Pertactin dient dem *Bordetella*-Phagen als Rezeptorprotein. Somit kann der Phage *Bordetella* in der Bvg+ Phase infizieren. Die Arbeitsgruppe um Liu konnte jedoch zeigen, dass in ca.  $10^{-6}$  Fällen *Bordetella* auch in der Bvg- Phase infiziert wird, indem andere Oberflächenproteine genutzt werden (Liu et al., 2002). Dies ist in ca.  $10^{-3}$  Fällen reversibel, sodass die Bvg+ Phase wieder zur Infektion genutzt werden kann. Bei einer dritten Variante, die abermals in ca.  $10^{-6}$  Fällen eintritt, ist der Phage befähigt, *Bordetella* in beiden Phasen zu infizieren. Ausgehend davon, in welcher Phase sie *Bordetella* infizieren, werden die Phagen als *Bvg plus tropic* Phage (BPP), *Bvg minus tropic* Phage (BMP) oder *Bvg indiscriminant* Phage (BIP) bezeichnet. Der damit verbundene Wechsel wird als Tropismenwechsel bezeichnet (Liu et al., 2002).

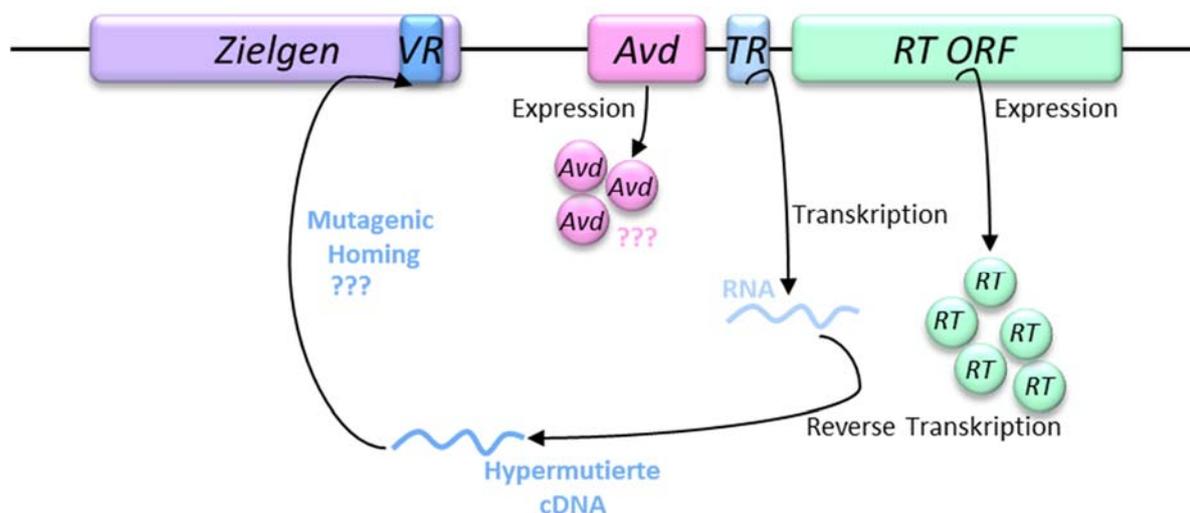
Bei einem Vergleich der verschiedenen Phagentypen wurde erkannt, dass sie sich in einer bestimmten variablen Region (VR) unterscheiden (Liu et al., 2002). Die VR ist eine 134 bp lange Sequenz und befindet sich am 3' Ende des *mtd* (major tropism determinant) Locus, welcher für ein Protein an den Spitzen der Schwanzfasern codiert. Ausschlaggebend für den Tropismenwechsel sind Änderungen in diesem Protein, welches das Oberflächenprotein Pertactin von *Bordetella* erkennt. Somit bestimmt die VR-Sequenz innerhalb des *mtd* Locus die Tropismenspezifität des Phagen. *Downstream* dieses offenen Leserahmens ORFs befindet sich eine Kopie der VR, welche jedoch keine Variabilität aufweist und als Template Repeat (TR) bezeichnet wird. Vergleicht man nun diese beiden Regionen, wird deutlich, dass nur an Stellen, an welchen sich Adenine in dem TR befinden, Änderungen in der VR auftreten. Diese Adenspezifität kontrolliert die Variabilität der VR, trotzdem sind bei 23 Adeninen in der 134 bp langen TR Sequenz theoretisch  $7 \cdot 10^{13}$  verschiedene Nukleotidsequenzen und  $9,2 \cdot 10^{12}$  Aminosäuresequenzen möglich (Doulatov et al., 2004; Liu et al., 2002). Eine weitere Besonderheit ist, dass sich die Mutationen in der VR meist in den ersten zwei Positionen eines Codons befinden (Medhekar und Miller, 2007; Minot et al., 2012). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer Aminosäuresubstitution maximiert (Liu et al., 2002), während Änderungen an der dritten Position weniger oft zu Aminosäuresubstitutionen führen (Crick, 1966). Zudem stehen die Aminosäuren der VR, welche in ihren Codons Adenine aufweisen, in direkter Verbindung mit der Rezeptorkontaktstelle (Miller et al., 2008).

Neben dem *mtd* ORF mit VR, also dem Zielgen, befinden sich in der DGR-Kassette des *Bordetella*-Phagen zwei weitere offene Leserahmen. Zum einen befindet sich im Anschluss an den *mtd* ORF die *accessory variability determinant* (Avd), deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist. An die bAvd, also die Avd aus der DGR des *Bordetella*-Phagen, schließen sich die TR und am 3' Ende der DGR-Kassette ein ORF an, welches für eine reverse Transkriptase (RT) kodiert. Im Falle der RT aus dem DGR des *Bordetella*-Phagen wird die RT als bRT bezeichnet (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematisch dargestellte DGR-Kassette des *Bordetella*-Phagen.** Die DGR-Kassette des *Bordetella*-Phagen weist das Zielgen *mtd* (lila) mit der variablen Region (VR) (dunkelblau) auf. Es folgen der ORF für *bAvd* (rosa) und *brt* (grün). Zwischen ihnen ist der Template Repeat (TR) (hellblau) angesiedelt, welcher identisch zu der VR ist, jedoch nicht hypermutiert wird.

Der tatsächliche DGR-Mechanismus ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig analysiert. Ein wahrscheinlicher Mechanismus ist jedoch in Abbildung 2 schematisch dargestellt und beginnt mit der Transkription der TR Sequenz. Die DGR eigene reverse Transkriptase erzeugt von dem TR-Transkript ausgehend eine hypermutierte cDNA (Guo et al., 2008), sodass es zu Adenin spezifischen Mutationen kommt. Wie diese hoch-spezifischen Hypermutationen generiert werden, konnte noch nicht untersucht werden. Die cDNA wird anschließend über einen Prozess, der *Mutagenic Homing* genannt wird, in die VR des Zielgens eingebaut und die VR somit ersetzt. Wie dieser Prozess im Detail abläuft ist auch weitgehend ungeklärt. Zudem ist die Rolle der akzessorischen variablen Determinanten, Avd, in diesem Ablauf ebenfalls noch nicht geklärt, auch wenn nachgewiesen werden konnte, dass sie für die Funktion des *Bordetella*-Phagen DGRs notwendig ist (Doulatov et al., 2004).



**Abbildung 2: Hypothetischer DGR-Mechanismus.** Die TR Sequenz (hellblau) wird transkribiert. Die DGR eigene RT (grün) erzeugt ausgehend von dem TR Transkript eine hypermutierte cDNA, in welcher Mutationen an Thymin-Stellen eingefügt werden. Diese cDNA wird nun im Zielgen (lila) an der Stelle der VR (dunkelblau) eingefügt. Dieser Mechanismus wird *Mutagenic Homing* genannt und ist noch weitgehend ungeklärt. Hierbei kommt es zum Einbau der hypermutierten cDNA und der Änderung in der VR. Die Funktion der Avd (rosa) in diesem Prozess ist ebenfalls noch unklar.

Das DGR-System des *Bordetella*-Phagen ist das Prototyp-DGR und somit das am besten erforschte. Bis 2008 wurden ca. 40 weitere Elemente in Bakterien und Phagen entdeckt, wie in *Vibrio harveyi* VHML-Phage, *Bacteroides thetaiotaomicron* oder *Nostoc sp.* PCC 7120 (Doulatov et al., 2004; Medhekar und Miller, 2007; Simon und Zimmerly, 2008). Seitdem wurden in einer Studie in 155 Bakterien und Phagen DGR-Systeme mit Hilfe der Analysesoftware DiGReF in öffentlichen Datenbanken entdeckt (Schillinger und Zingler, 2012; Schillinger et al., 2012). Zudem konnten durch das *Human Microbiome Project*, welches Mikrobiome des menschlichen Darms mittels Sequenzierungen identifizierte (Peterson et al., 2009), mit dem Computer-Programm DGRscan im Jahre 2014 weitere 271 DGR-Systeme im menschlichen Mikrobiom analysiert werden (Ye, 2014). Jedoch konnten keine DGR-Systeme in Eukaryoten nachgewiesen werden. Analysen der neu entdeckten Elemente zeigten, dass die DGR-Kassetten einen unterschiedlichen Aufbau aufweisen können, jedoch in allen Fällen eine VR innerhalb des Zielgens, TR und RT ORF besitzen. Die akzessorische variable Determinante (Avd) konnte hingegen nicht in allen entdeckten DGR-Systemen nachgewiesen werden (Schillinger und Zingler, 2012). Die DGRs aus den Cyanobakterien *Nostoc* und *Trichodesmium* besitzen beispielsweise nur einen ORF, der für eine RT kodiert, aber zwei Zielgene mit je einer variablen Region. Zudem ist bei diesen DGRs die TR *downstream* des RT-ORFs angesiedelt (Doulatov et al., 2004). Ausgehend von ihrem Aufbau wurden DGR-Systeme in vier verschiedene Gruppen gegliedert. Bei Gruppe 1 liegt die TR *upstream* der RT, während sie in Gruppe 2 *downstream* angesiedelt ist. In Gruppe 3 überlappt die TR mit dem 5' oder 3'

Ende des RT ORF. Gruppe 4 weist eine Besonderheit auf, bei welcher der RT ORF auf einem Strang und VR, Zielgen und TR auf dem anderen Strang liegen, sodass kein gemeinsames RNA-Transkript verwendet wird. Die Gruppen 1-3 kann man in zusätzliche Untergruppen unterteilen, die sich in Anzahl und Position der Zielgene unterscheiden können (Schillinger et al., 2012). Diese diverse Strukturen und das weit verbreitet Vorkommen von DGRs in Prokaryoten und Archaeen lassen auf eine signifikante Funktion schließen. Beispielsweise kann die Hypermutation von DGR mit dem Jäger-Beute-Modell verglichen werden. Proteine binden entweder verschiedene Zielrezeptoren und fungieren dabei als Jäger, oder werden selbst gebunden und sind somit die Beute. Jäger müssen sich diversifizieren, um neue Ziele binden zu können, während die Beute sich diversifizieren muss, um nicht gebunden zu werden. DGRs im *Bordetella*-Phagen sind nach diesem Prinzip Jäger, die sich an die Oberflächenstruktur von *Bordetella* anpassen (McMahon et al., 2005), während beispielsweise DGRs in Cyanobakterien sich möglicherweise als Beute diversifizieren, um nicht von Cyanophagen befallen zu werden. Weitere Wirkungsmechanismen von DGRs in der Natur sind noch nicht bekannt, jedoch werden zukünftig mit der Entdeckung von DGRs in weiteren Organismen andere Funktionen analysiert werden können, wie z.B. Anpassung an Stresssituationen oder Wirtsorganismen. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Komponenten des DGR-Systems näher beschrieben, sowie über den Mechanismus und Struktur bekannt ist.

### 1.1.1 Variable Region und Template Repeat

DGRs können ein bestimmtes Zielgen unendlich oft hypermutieren, indem die VR innerhalb des Zielgens mit einer mutierten Kopie der TR ersetzt wird. Die VR ist durchschnittlich  $100 \pm 50$  bp, aber maximal 180 bp lang. Diese Limitierung der VR hat vermutlich funktionelle Gründe, da die Hypermutation eines größeren Teils des Proteins dessen Funktion stören könnte (Schillinger et al., 2012). Die Hypermutation der VR Sequenz und somit der Sequenz des Zielgens führt zu einer hohen Diversität des Zielproteins und folglich zu einem kraftvollen Motor der Evolution. Dazu ist es jedoch unbedingt notwendig, dass das Original, also die TR, unverändert bleibt. Eine Änderung der TR würde nämlich zu Mutationen von Adenine zu Cytosin, Guanin oder Thymin führen, sodass letztendlich keine Diversifizierung mehr möglich und somit das System zerstört wäre. Um zu gewährleisten, dass die TR Sequenz nicht durch die hypermutierte cDNA ersetzt wird, müssen VR und TR Unterschiede aufweisen. Am 3' Ende von VR und TR des *Bordetella*-Phagen DGRs befinden sich eine 14 bp lange Sequenz, die nur aus Gs und Cs besteht, und eine 21 bp lange GC-reiche Sequenz, welche keinen Mutationen unterliegen. Diese 21 bp langen Sequenzen unterscheiden sich in VR und TR an exakt fünf Basen und werden *Initiation of Mutagenic Homing*, IMH in VR und IMH\* in TR, genannt (Doulatov et al., 2004;

Guo et al., 2008). Doulatov et al. konnten in Experimenten nachweisen, dass der Austausch von IMH in der VR durch IMH\* zu keiner Hypermutation in VR führt, während ein Austausch der IMH\* in TR mit IMH zu einer Hypermutation in der TR führt (Doulatov et al., 2004). Folglich sind für den gerichteten Transfer der Sequenzinformation IMH bzw. IMH\* notwendig. Direkt *downstream* der IMH liegt ein weiteres Element, welches eine zusätzliche Voraussetzung für einen effizienten *Retrohoming* Prozess zu sein scheint. Dabei handelt es sich um eine GC-reiche Haarnadelstruktur, die aus einem 7-10 bp Stamm und einer 4 bp Schleifenregion besteht (Guo et al., 2011). Hierbei scheint die Stammregion als Struktur eine wichtige Rolle zu spielen; ihre Funktion ist somit sequenzunabhängig. Im Gegensatz dazu unterliegt die Schleifenregion einer Sequenzspezifität und bildet, ausgehend von verwandten DGR-Systemen, den Consensus 5'-GRNA-3' (Guo et al., 2011). In anderen RNA-Molekülen, die viele Sekundär- und Tertiärstrukturierungen aufweisen, konnte ein sehr ähnlicher Consensus (5'-GNRA-3') gefunden werden. Hierbei spielt diese Struktur eine stabilisierende bzw. verankernde Rolle (Abramovitz und Pyle, 1997; Costa und Michel, 1995; Woese et al., 1990). Da der zu dieser Sequenz komplementäre Strang ebenfalls die Voraussetzungen zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur hat, ist es möglich, dass dieses Element als Kreuzstruktur aktiv ist (Guo et al., 2011). Die Haarnadelstruktur konnte in verschiedenen Phagen und Phagen-ähnlichen DGR-Systemen beobachtet werden. Ferner wird angenommen, dass die Struktur in vielen weiteren DGR-Systemen vertreten ist. Welche Funktion diese Struktur während des *Homing*-Prozesses ausübt ist bis heute noch nicht geklärt. Jedoch weist die weite Verbreitung und die starke Konservierung der Sequenzen auf eine entscheidende Funktion der Haarnadelstruktur hin. Denkbar ist beispielsweise eine Funktion als Erkennungselement oder ein direkter Kontakt mit anderen wichtigen DGR-Komponenten, wie der RT oder Avd (Guo et al., 2011).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Sequenzen inmitten der TR für den *Homing* Prozess nicht notwendig sind, sondern nur kurze homologe Sequenzen benötigt werden (Guo et al., 2008). Auch am 5' Ende der TR wird nur eine kurze Sequenz für die Integration benötigt. Weitere besondere Anforderungen am 5' Ende der VR konnten nicht entdeckt werden, sodass die Integration am 5' Ende möglicherweise über die Homologie von VR und TR fortgeführt wird. Die Integration der kompletten cDNA ereignet sich vermutlich durch Templataustausch (template switching) oder Strangverlagerung (*strand displacement*) (Guo et al., 2008). Zudem ist für die Integration die GC-reine Sequenz sowie die IMH am 3' Ende von Nöten. Generell findet die Integration der hypermutierten Sequenz immer *upstream* der GC-reinen Sequenz und der IMH statt. Das GC-reine Element fungiert hierbei als Initiator für die cDNA-Synthese während des *Homing* Prozesses und ist für den DGR-Mechanismus notwendig (Guo et al., 2008). Prinzipiell scheint für die Integration die Homologie der Sequenzen ausschlaggebend, da keine weiteren sequenzspezifischen Erkennungsmerkmale beobachtet werden

konnten. Ferner wird eine Insertion von bis zu 200 zusätzlichen Basen in die TR des *Bordetella*-Phagen toleriert (Guo et al., 2008).

### 1.1.2 Das Zielprotein

Das Zielgen, also das Gen, welches durch die Hypermutation der VR verändert wird, kann großen Einfluss auf die Anpassung des Organismus an die Umwelt haben. Jedoch ist über die verschiedenen Zielgene, vor allem bezüglich ihrer Funktion, noch sehr wenig bekannt.

Das Zielprotein des DGR-System des *Bordetella*-Phagen ist die *mtd* (*major tropism determinant*), welche zur Adaption an *Bordetella*-Oberflächenmoleküle genutzt wird. Somit ist es dem *Bordetella*-Phagen möglich seinen Wirt in unterschiedlichen Phasen erfolgreich zu infizieren. Jedoch ist im Allgemeinen noch vieles über die Zielgene von DGRs und deren Auswirkungen unbekannt, da bis heute die einzige bekannte Funktion die des DGR aus dem *Bordetella*-Phagen als Prototyp ist. In einer aktuellen Studie wurden von 155 entdeckten DGR-Kassetten die Zielgene untersucht (Schillinger und Zingler, 2012). Über die Hälfte der analysierten Zielgene waren mit „hypothetischer Funktion“ oder als Domänen unbekannter Funktion (DUF) deklariert. Ein weiterer großer Anteil konnte der Superfamilie der *formylglycine-generating* Sulfatasen (FGE, *formylglycine-generating* Enzyme) und *mtd*-Homologen zugeordnet werden. Bei näheren Sequenzanalysen konnte eine Ähnlichkeit der beiden Gruppen nachgewiesen werden, sodass eine gewisse Verwandtschaft dieser Proteingruppen angenommen werden kann (Schillinger und Zingler, 2012). Le Coq und Gosh spekulierten auf einen gemeinsamen Vorfahren der Proteingruppen, da diese Oligopeptidmotive spezifisch erkennen können und somit eine Erkennungsfunktion aufweisen (Le Coq und Ghosh, 2011; Schillinger und Zingler, 2012). Zudem konnten kürzlich in *Trichodesmium* 12 Gene identifiziert werden, die möglicherweise durch das *Trichodesmium* eigene DGR hypermutiert werden (Pfreundt et al., 2014). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde lediglich von bis zu vier Zielproteinen eines DGR-Systems berichtet (Schillinger und Zingler, 2012). Alle 12 Zielgene in *Trichodesmium* weisen eine VR auf, die sich im Vergleich zur TR an Adenin-Positionen unterscheiden. Über die Regulation sowie die genaue Funktion der 12 Gene in *Trichodesmium* kann nur spekuliert werden, jedoch konnten die 12 Gene der FEG Sulfatase Superfamilie zugeordnet werden. Im Falle von *Trichodesmium* wird vermutet, dass die Hypermutation der Zielgene eine Fluchtstrategie vor Bakteriophagen ist, indem multiple Oberflächenmoleküle diversifiziert werden (Pfreundt et al., 2014). Das marine Cyanobacterium *Prochlorococcus* nutzt beispielsweise ebenfalls Genmutationen als Fluchtstrategien (Avrani et al., 2011). Multiple Zielgene können durch Genduplikationen verursacht werden, jedoch sind in diesen Fällen häufig ein oder mehrere Systeme inaktiv (Pfreundt et al., 2014; Schillinger et al., 2012).

Weitere Informationen über das Zielgen konnten mit dem Aufklären der Kristallstruktur der *mtd* des *Bordetella*-Phagen gewonnen werden. Das Protein bildet ein pyramidenförmiges Trimer (McMahon et al., 2005). Dieses besteht aus einem starren Gerüst, welches aus konservierten Aminosäuren und variablen Regionen aufgebaut ist. Diese Zusammensetzung erlaubt einerseits einen hohen Grad an Variabilität der an den Oberflächen liegenden Aminosäuren, während andererseits die Stabilität und Struktur im Inneren erhalten bleiben. Das analysierte Faltungsmuster ähnelt dem von C-Typ Lektin (Le Coq und Ghosh, 2011; Medhekar und Miller, 2007; Weis et al., 1991). Dieses Faltungsmuster konnte ebenfalls bei Zielgenen aus *Treponema denticola*, TypA, nachgewiesen werden, sodass diese Faltung ein weit verbreitetes Mittel für Sequenzdiversität in DGRs darstellen könnte (McMahon et al., 2005; Miller et al., 2008).

Trotz der Entdeckung diverser Zielgene und Datenbankanalysen kann den Zielgenen keine konkrete Funktion zugeschrieben werden, abgesehen des DGR-Systems des *Bordetella*-Phagen. Obwohl noch keine weiteren biologischen Funktionen bekannt sind, dient der Mechanismus der Hypermutation von exakt definierten Zielgenen vermutlich der Anpassung an schnell auftretende Änderungen in der Umwelt, auch wenn es keine universelle Funktion für die verschiedenen Zielproteine gibt.

### 1.1.3 Die reverse Transkriptase

Reverse Transkriptasen (RTs), also RNA-abhängige DNA-Polymerasen, sind das Hauptmerkmal für alle Retrotransposons (Eickbush und Jamburuthugoda, 2008; Mathias et al., 1991; Saigo et al., 1984; Xiong und Eickbush, 1990). 1970 wurde die Enzymklasse der RTs von Howard Temin und David Baltimore erstmals beschrieben (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Die Bezeichnung reverse Transkriptase wurde gewählt, da der Prozess der Transkription umgekehrt und aus einem RNA-Templat komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wird. Durch die Entdeckung von RTs ist das zentrale Dogma der Biologie, also der unidirektionale Informationstransfer von DNA zu RNA und letztendlich zu Proteinen, als starrer Ablauf überholt. Temin erhielt zusammen mit Baltimore und Renato Dulbecco für diese Entdeckungen im Jahre 1975 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Um weitere Informationen über Aufbau und Funktion der reversen Transkriptasen zu erhalten wurde versucht, die Kristallstruktur einer RT aufzuklären. Diese Strukturanalyse stellte sich von Anfang an problematisch dar, da RTs *in vitro* oft eine mangelnde Löslichkeit und Stabilität aufweisen. Um die Kristallstruktur der RT aus dem HIV zu lösen, wurden mittels Polymeraser Kettenreaktion (PCR) Mutationen im RT-ORF eingeführt, die die Ausbeute an löslichem Protein enorm erhöhten (D'Aquila und Summers, 1989). Anfang 1990 konnte die Kristallstruktur der HIV-RT dann aufgeklärt werden

(Jacobo-Molina et al., 1993; L. A. Kohlstaedt et al., 1992). Als weiteres Beispiel dient die RT aus dem Moloney Murinen Leukämievirus (M-MLV). Hier wurden ebenfalls Mutationen im ORF der RT eingeführt und sogar Deletionen von ungeordneten Bereichen durchgeführt, um die Löslichkeit zu erhöhen und schließlich die Kristallstruktur aufzuklären (Das und Georgiadis, 2004, 2001). Die Ergebnisse der Strukturanalysen zeigten eine ähnliche Form wie die meisten Polymerasen. Diese ist vergleichbar mit der Form einer rechten Hand und weist eine Daumen-, Finger- und Handflächendomäne auf (L. A. Kohlstaedt et al., 1992). Dabei ist in der Handfläche das katalytische Zentrum der Polymerase lokalisiert. Finger haben die Aufgabe Nukleotidtriphosphate mit den Templatbasen zu verbinden, während die Daumendomäne an der Platzierung und Translokation der DNA beteiligt ist. Zudem spielen Finger und Daumen in der Substraterkennung eine wichtige Rolle. Außerdem weist die Struktur einer RT eine weitere RNase H Domäne und eine Verbindungsdomäne auf (Jacobo-Molina et al., 1993; L. A. Kohlstaedt et al., 1992).

Es wird angenommen, dass RTs den Templatwechsel von RNA zu DNA als Hauptinformationsträger unterstützen haben und somit eine evolutionär alte Klasse von Enzymen darstellen. Ebenso weisen alle RTs eine hohe Aminosäureübereinstimmung auf, was denselben Ursprung nahelegt (Temin, 1989). RTs wurden zuerst in Tumoviren entdeckt, welche seither als Retroviren bezeichnet werden (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Bei Retroviren, wie zum Beispiel dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), wird die RT benötigt um das virale RNA-Genom in DNA zu transkribieren und anschließend in das Wirtsgenom zu integrieren (Fauci, 1987). Einige RTs, wie die des HI-Virus, besitzen keine Korrekturfunktion (*proof-reading*), wodurch sich eine sehr hohe Fehlerrate ergibt und der Einbau von Punktmutationen begünstigt wird (Preston et al., 1988; Roberts et al., 1988). Jedoch ist die errechnete Mutationsrate von HI-Virus niedriger als die Fehlerrate der aufgereinigten HIV RT. Somit sind nicht die reverse Transkription, sondern andere Prozesse des Infektionszyklus die limitierenden Faktoren und das HI-Virus ist weniger fehleranfällig als die RT selbst (Mansky und Temin, 1995).

Die beobachteten Adenin-Substitutionen in der VR scheinen während der reversen Transkription von der DGR-RT generiert zu werden. Einen experimentellen Beleg gibt es dafür noch nicht, jedoch sind bei der Entstehung der TR RNA Zwischenstufe noch keine Mutationen erkennbar (Guo et al., 2008). Erst nach der cDNA-Synthese durch die DGR-RT können die hochspezifischen Mutationen nachgewiesen werden. Zudem wird diese Theorie von der oben erwähnten hohen Fehlerrate von RTs im Allgemeinen unterstützt. RTs sind im Stande Mutationen herbeizuführen und auch Präferenzen aufzuweisen (Mansky und Temin, 1995). Jedoch ist keine Gruppe von RTs bekannt, die hochspezifische basenabhängige Mutationen wie Adenin-Substitutionen generieren kann. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte das Serin-Glutamin-Motiv (SQ-Motiv) innerhalb der vierten Domäne von

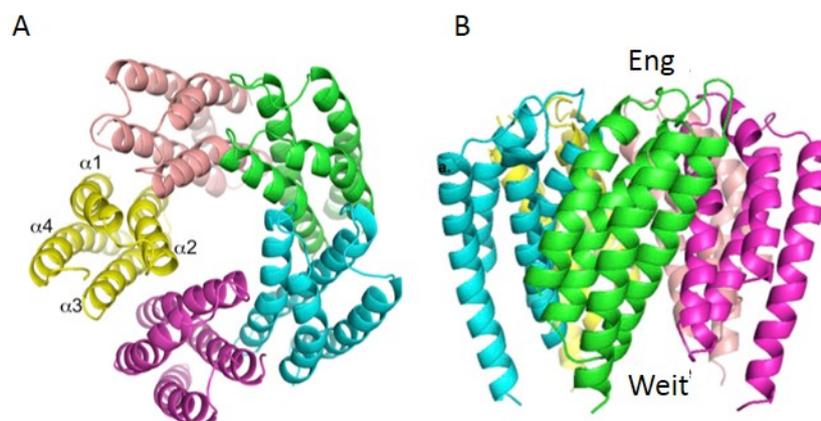
DGR-RTs sein. Dieses scheint charakteristisch für DGR-RTs zu sein, da RTs aus verwandten Elementen ein Serin-Prolin-Motiv (SP-Motiv) an dieser Position aufweisen (Schillinger, 2013; Schillinger et al., 2012). Hierbei ist bekannt, dass der Prolinrest der HIV-RT unter anderem an der dNTP-Erkennung sowie an der Bindung des Templates beteiligt ist (Klarmann et al., 2000). Das DGR-charakteristische SQ-Motiv, bei welchem der Prolinrest gegen Glutamin ausgetauscht ist, könnte also essentiell für die spezifischen Adenin-Substitutionen sein (Schillinger, 2013). Zudem weisen DGR-RTs im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen RTs keine RNase H Domäne auf. Diese strukturellen Merkmale und das SQ-Motiv sind somit die auffälligsten Charakteristika der DGR-RTs, wodurch eine gezielte Erkennung ermöglicht wird. Ferner sind DGR-RTs 260 bis 527 Aminosäuren (aa) groß, mit einer durchschnittlichen Größe von 377 bzw. 378 aa (Schillinger et al., 2012; Simon und Zimmerly, 2008).

Wie auch die oben beschriebenen RTs aus verschiedenen Organismen, weist die RT aus dem DGR des *Bordetella*-Phagen eine niedrige Löslichkeit auf. Daher wurde auch hier die Löslichkeit mittels Punktmutation erhöht, um weitere Analysen durchführen zu können (Alayyoubi et al., 2013). Die Gruppe Liu et al. konnte 2002 zwar die heterologe Expression und Aufreinigung aus Einschlusskörperchen der RT aus dem DGR der *Bordetella*-Phage beschreiben (Liu et al., 2002), allerdings konnte keine funktionelle oder biochemische Analyse der RT durchgeführt werden. Grund dafür ist vermutlich die mangelnde Stabilität der RT *in vitro* sowie die Tatsache, dass die Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörperchen problematisch sein kann (Alayyoubi et al., 2013), da unter anderem die Ausbeute oder die Integrität der Proteine beeinträchtigt werden können (Sørensen und Mortensen, 2005).

#### 1.1.4 Die akzessorische variable Determinante

In vielen DGR-Systemen, wie in dem des *Bordetella*-Phagen (Abbildung 1), konnte ein Gen identifiziert werden, welches für die Avd kodiert (Doulatov et al., 2004; Medhekar und Miller, 2007) und zwischen VR und TR lokalisiert ist. Die bAvd aus dem DGR-System des *Bordetella*-Phagen ist ein 14,5 kDa schweres Protein. Alayyoubi et al. konnten 2012 die Quartärstruktur der Avd entschlüsseln und entdeckten eine pentamere Faserstruktur, die wiederum aus Vier-Helix-Monomeren bestehen, mit einer sanduhrförmigen Pore im Zentrum (Abbildung 3 A). Zudem ist ein Ende der Pore enger als das andere (Abbildung 3 B). Diese Erkenntnisse werden von den Daten über die Avd aus *Nostoc sp.* PCC 7120 unterstützt. Hier konnte ebenfalls eine tetramere oder pentamere Struktur beobachtet werden (Schillinger, 2013). Strukturell ähnelt das Avd Protein ringförmigen DNA-Klammern, wie der Untereinheit der *Escherichia coli* (*E. coli*) DNA Polymerase III und des *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigens* (Kong et al., 1992; Krishna et al., 1994), jedoch ist die Pore der bAvd für

Nukleinsäureinteraktionen zu eng. Zudem sind die Aminosäurereste im Innern der Pore kaum konserviert, sodass von einer strukturellen und nicht von einer funktionalen Rolle ausgegangen werden muss (Alayyoubi et al., 2013).



**Abbildung 3: Pentamere Faserstruktur der Avd.** Jeder Protomer ist wiederum aus vier Helix-Monomeren aufgebaut und im Bändermodell unterschiedlich farblich markiert. Im Zentrum ist eine sanduhrförmige Pore angesiedelt (A), bei welcher ein Ende enger ist als die andere (B) (Nach Alayyoubi et al., 2013).

Mit Hilfe verschiedener Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die bAvd für den *Homing* Prozess wichtig ist, da die *Retrohoming*-Frequenz ohne die bAvd deutlich vermindert wird. Hierbei spielen vor allem zwei Aminosäuren an der Oberfläche der bAvd eine essentielle Rolle. Zudem konnte eine enge Verbindung zwischen bAvd und bRT nachgewiesen werden. Hierbei interagieren genau diese beiden Aminosäurereste mit der bRT. Somit scheint ein Komplex aus bRT und bAvd wichtig für den *Homing* Prozess zu sein (Alayyoubi et al., 2013). Neben der kodierenden Sequenz der bAvd bildet sie zusätzlich einen Teil der TR aus, sodass angenommen wird, dass diese kodierende Sequenz der bAvd auch ein strukturelles Element der TR formt. Welche Funktion dieses Element besitzt ist jedoch nicht bekannt (Alayyoubi et al., 2013).

Die Avd ist positiv geladen und ist in der Lage Nukleinsäuren zu binden. In bisherigen Analysen konnten keine Sequenzspezifität und keine Präferenz für einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäuren beobachtet werden (Alayyoubi et al., 2013; Schillinger, 2013). Zudem konnte zwar die Bindung an Nukleinsäuren, aber keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden (Alayyoubi et al., 2013). Die genaue Funktion der Avd gilt es demzufolge noch zu charakterisieren. Zudem sind nicht in allen DGR Systemen Avd-Homologe vertreten, womit sich die Frage stellt, wie sich diese Systeme verhalten und wie dies kompensiert wird. Eventuell besitzen diese DGR-Systeme auch Avd Homologe, die jedoch

noch nicht entdeckt werden konnten. In einigen dieser Elemente ohne Avd wurden Sequenzen beschrieben, die mit dem RT-Gen überlappen und eventuell für *eine Helicase and RNaseD C-terminal* Domäne (HRDC) kodieren (Medhekar und Miller, 2007). HRDC Domänen haben ebenfalls die Eigenschaft Nukleinsäuren zu binden (Liu et al., 1999). Auch wenn sie strukturelle Unterschiede zur Avd aufweisen (Bernstein und Keck, 2005), könnten sie möglicherweise die Rolle der Avd übernehmen und somit das Nichtvorhandensein der Avd kompensieren. Des Weiteren konnte eine Sequenzähnlichkeit der Avd zu S23 ribosomalen und S23 ribosomal-ähnlichen Proteinen (Pronk und Sanderson, 2001; Ralph und McClelland, 1993) gezeigt werden, jedoch sind deren Funktionen ebenso unbekannt.

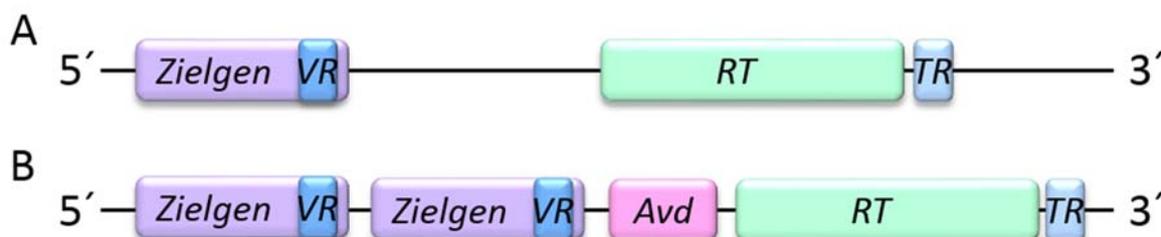
## 1.2 Die DGR-Systeme aus *Nostoc*

Seit der Entdeckung von DGRs konnten sie in einer Vielzahl von Bakterien- und Phagen-Systemen identifiziert werden (Doulatov et al., 2004; Minot et al., 2012; Schillinger et al., 2012; Simon und Zimmerly, 2008; Ye, 2014). Einer dieser Organismen ist *Nostoc*, welcher zu der Klasse der Cyanobakterien gehört. Cyanobakterien sind phototrope Prokaryoten, die alle typischen Charakteristika von gram-negativen Bakterien aufweisen. Darüber hinaus sind sie in der Lage Photosynthese zu betreiben. Einige Cyanobakterien wie die Gattung *Nostoc* sind zudem der Stickstoffbindung befähigt. Cyanobakterien besiedeln weltweit verschiedenste Habitate, da sie sich extremen Bedingungen anpassen können, auch wenn sie bevorzugt in Süßgewässern gefunden werden (Rasmussen und Svenning, 1998). Die Übertragung von genetischen Informationen geschieht unter anderem mittels horizontalem Gentransfer, welcher eine wichtige Rolle in der Evolution von Cyanobakterien spielt (Ikeuchi und Tabata, 2001; Zhaxybayeva et al., 2006). Die Gattung *Nostoc* bildet kugelige oder hautartige Kolonien aus, die aus langen Zellfäden bestehen (Rasmussen und Svenning, 1998; West und Adams, 1997).

In den Arten *Nostoc sp.* PCC. 7120 oder *Nostoc punctiforme* PCC 73102 konnten verschiedene DGR-Systeme beschrieben werden (Doulatov et al., 2004; Schillinger et al., 2012).

DGR-Kassetten in *Nostoc sp.* PCC 7120 weisen eine TR auf, jedoch können sie zwei VRs (VR1 und VR2) besitzen, welche Bestandteil paraloger ORFs sind (Abbildung 4). Abgesehen von Positionen, welchen Adenine in der TR entsprechen, sind diese beiden VRs identisch zueinander. Dies kann, wie oben erörtert, auf eine Genduplikation hinweisen, wobei die Möglichkeit einer Inaktivierung eines der Zielgene besteht (Lynch und Conery, 2000; Schillinger et al., 2012). Zudem enthalten generell einige Cyanobakterien Arten mehrere DGRs, welche keine Homologien aufweisen und bei unabhängigen

Gentransferereignissen erworben wurden (Doulatov et al., 2004). Die TR befindet sich in *Nostoc* DGRs *downstream* des RT-ORFs und somit können sie nach Schillinger et al. in die zweite Gruppe eingeordnet werden (Schillinger et al., 2012).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der DGR-Systeme in *Nostoc sp.* PCC 7120** nach Doulatov et al 2004. In lila sind die Zielgene mit der variablen Region (VR) (dunkelblau) dargestellt. Es folgen die ORFs für Avd (rosa) und RT (grün). Downstream der RT ist der Template Repeat (TR) (hellblau), welcher identisch zu den VRs ist, jedoch nicht hypermutiert wird, angesiedelt. A: DGR-Kassette mit einem Zielgen und einer VR und ohne ORF für Avd. B: DGR-Kassette mit zwei paralogen Zielgenen und je einer VR. Zudem ist ein Avd-ORF enthalten.

Mögliche Nutzen von DGRs für *Nostoc* könnten beispielsweise die Anpassung an Hitze oder andere Umwelteinflüsse sein. Zudem kann durch Variabilität möglicherweise eine Befall vor Cyanophagen (Bancroft und Smith, 1988; Lambert und Carr, 1984) vermieden werden. Ein weiterer Nutzen könnte auch die Anpassung an neue Symbiosepartner (Rasmussen und Svenning, 1998) sein.

### 1.3 Zielsetzung

DGRs stellen eine einzigartige Klasse von mobilen genetischen Elementen dar, da sie durch gezielte Hypermutationen ihrem Wirt einen evolutionären Vorteil verschaffen können. Diese Fähigkeit der spezifischen Hypermutation bedeutet in der Gentechnik eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Umso verwunderlicher ist es, dass bis zum heutigen Zeitpunkt nur sehr wenig über DGRs bekannt ist. Neben dem *Bordetella*-Phagen DGR gibt es kaum weitere funktionelle Analysen, die jedoch zum Verständnis von DGRs erforderlich sind. Zudem konnte bis dato nur die konkrete biologische Funktion des DGRs aus dem *Bordetella*-Phagen gezeigt werden. Somit verbleibt die Funktionsweise von DGRs sehr abstrakt. Daher war es Hauptgegenstand dieser Arbeit das DGR aus *Nostoc sp.* PCC 7120 zu untersuchen, um zum Verständnis der Wirkungsweise und dessen biologischer Funktion beizutragen und somit die Ausbreitung und Anwendung von DGRs zu verdeutlichen. Dazu wurden zwei essentielle Komponenten des DGR-Systems, die elementeigene RT sowie das akzessorische Protein, untersucht.

Die Gruppe Liu et al. konnte 2002 zwar die heterologe Expression und Aufreinigung aus Einschlusskörperchen der RT aus dem DGR der *Bordetella*-Phage beschreiben (Liu et al., 2002), allerdings konnte keine funktionelle oder biochemische Analyse der bRT durchgeführt werden. Grund dafür ist vermutlich die mangelnde Stabilität der bRT *in vitro*. Zwar konnte mittlerweile eine Aktivität der bRT nachgewiesen werden, jedoch stellte auch hier die Stabilität der bRT ein Problem dar (Alayyoubi et al., 2013). Gegenstand dieser Studien war es somit die Expression, Aufreinigung und vor allem die Stabilität der nRT zu verbessern, sodass nachfolgende Aktivitäts- und Mutationsanalysen erfolgen können. Dies war trotz weitreichender Untersuchungen bis dato nicht möglich und bleibt somit von höchstem Interesse, denn beispielsweise gibt es noch keinen experimentellen Nachweisen dafür, dass die RT tatsächlich für den Einbau der hochspezifischen Adenin-Substitutionen verantwortlich ist.

Auch die Funktion sowie der Wirkungsort der Avd sind weitestgehend ungeklärt, obwohl bekannt ist, dass die Avd für das *mutagenic Homing* von großer Bedeutung ist. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Avd Nukleinsäuren bindet (Alayyoubi et al., 2013; Schillinger, 2013) und möglicherweise als Nukleinsäurechaperon fungiert (Schillinger, 2013), die genaue Funktion der Avd gilt es dennoch zu charakterisieren. Daher widmet sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der detaillierten Charakterisierung der nAvd. Hierzu sollte untersucht werden, ob die nAvd verschiedene Funktionen von Nukleinsäurechaperonen ausführen kann, wie beispielsweise die Hybridisierung von Nukleinsäuren, Strangaustausche oder die Stabilisierung von Nukleinsäuren. Darüber hinaus sollte das Bindungsverhalten der nAvd gegenüber verschiedener Nukleinsäuren genauer analysiert werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von Appllichem GmbH, Darmstadt, bezogen. Hierzu wurde der für molekularbiologische Methoden geeignete Reinheitsgrad genutzt. Bei Chemikalien, welche nicht von Appllichem GmbH bezogen wurden, wurde mindestens der Reinheitsgrad *pro analysi* (p.A.) genutzt. Diese Chemikalien sowie die Hersteller sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, die nicht von Appllichem GmbH bezogen wurden**

Chemikalie	Hersteller
40% Acrylamid:Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin 86%	Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern
Glycin (Elektrophoresegrad)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Imidazol (Ultral Grade)	Calbiochem/Merck-Millipore
Isopropanol	J.T Baker Inc., Europe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure 37%	J.T Baker Inc., Europe
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Für RNase-freie Arbeiten (jeweils Molecular Biology Grade)

Ethylendiamintetraacetat -Lösung (0,5 M)

Calbiochem/Merck-Millipore, Darmstadt

Magnesiumchlorid-Lösung (1 M)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Nukleotidtriphosphat-Set

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## 2.1.2 Lösungen und Puffer

### 2.1.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### Agarosegele

#### Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE, 50x)

1 % (w/v) Agarose

2 M Tris (Base)

40 mM Tris

1 M Essigsäure

20 mM Essigsäure

50 mM EDTA

1 mM EDTA

0,03 µg/ml Ethidiumbromid

#### 5x KCM-Lösung für Transformationen

#### Alkalische Lyse - Lösung 1

500 mM KCl

50 mM Glucose

150 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM EDTA (pH 8,0)

250 mM MgCl<sub>2</sub>

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

**Alkalische Lyse - Lösung 2**

0,2 N NaOH

1 % (w/v) SDS

**Alkalische Lyse - Lösung 3**

3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

890 mM Borsäure

20 mM EDTA

**Tris/Borat/EDTA-Puffer (TBE, 10x)**

890 mM Tris (Base)

**Annealing-Puffer (10x)**

200 mM Tris-Cl (pH 7,5)

500 mM NaCl

**Polyacrylamidgele**

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

5 % (w/v) Acrylamid

8 M Harnstoff (nur bei denaturierenden Gelen)

0,05 % (w/v) Ammonium

**Elutionspuffer für Aufreinigungen aus PAA-Gelen**

10 mM MOPS (pH 6,0)

300 mM NaCl

1 mM EDTA (pH 8,0)

**Urea-Ladepuffer (2x) 120 µl**

0,17 g Urea

10 µl Tris pH 7,5 (1M)

40 µl 50 % Saccharose

0,4 µl EDTA (0,5 M)

2 % Farbstoff (Xylencyanol (XC),  
Bromphenolblau (BB))

***in vitro*-Transkriptionspuffer (10x)**

400 mM Tris-Cl (pH 8,0)

100 mM NaCl

220 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM Spermidin

0,1 % (v/v) Triton X-100

**2.1.2.2 Arbeiten mit Proteinen**

**Polyacrylamidgele - Trenngel**

375 mM Tris-Cl (pH 8,8)

8 bis 15 % (w/v) Acrylamid

0,1 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat

0,1 % (v/v) TEMED

**Polyacrylamidgele - Sammelgel**

190 mM Tris-Cl (pH 6,8)

5 % (w/v) Acrylamid

0,2 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat

0,1 % (v/v) TEMED

**SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)**

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1 % SDS (w/v)

**2x SDS-Ladepuffer**

4 % SDS

0,2 % (BB)

20 % Glycerol

10 mM Tris-HCL, pH6,8

$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ ME)

**Coomassie-Färbelösung**

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

**Entfärbelösung**

55 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Eisessig

**Aufreinigung Alr3497 (RT)**

Ni-NTA-Aufreinigung

*Lysepuffer*

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

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

1 Tablette Proteaseninhibitor/ 10 ml

(Roche, Mannheim)

*Waschpuffer*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 M NaCl

20 mM Imidazol

*Elutionspuffer I*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

*Elutionspuffer II*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

350 mM Imidazol

*Elutionspuffer III*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

500 mM Imidazol

*Lagerpuffer*

40 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 mM MgCl

50 % (v/v) Glycerin

2 mM DTT

Heparin-Agarose-Aufreinigung

*Heparin-Waschpuffer*

10 mM Tris (pH 7,5)

*Heparin-Elutionspuffer I*

10 mM Tris (pH 7,5)

750 mM NaCl

*Heparin-Elutionspuffer II*

10 mM Tris (pH 7,5)

1 M NaCl

*Heparin-Elutionspuffer III*

10 mM Tris (pH 7,5)

2 M NaCl

*Heparin-Elutionspuffer IV*

10 mM Tris (pH 7,5)

2,5 M NaCl

*Heparin-Elutionspuffer V*

10 mM Tris (pH 7,5)

5 M NaCl

Denaturierende Aufreinigung

*NPI-10*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0 (NaOH)

*DNPI-10*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

8 M Urea

pH 8,0 (NaOH)

*DNPI-20*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

8 M Urea

pH 8,0 (NaOH)

*DNPI-250/350/500*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

250/ 350/ 500 mM Imidazol

8 M Urea

pH 8,0 (NaOH)

**Aufreinigung Alr3496 (nAvd)***Lysepuffer*

50 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 % (v/v) Glycerin

1 M NaCl

10 mM Imidazol

*Waschpuffer*

50 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 % (v/v) Glycerin

1 M NaCl

100 mM Imidazol

*Elutionspuffer*

50 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 % (v/v) Glycerin

1 M NaCl

500 mM Imidazol

*Lagerpuffer*

10 mM Tris-Cl (pH 8,0)

50 % (v/v) Glycerin

150 mM NaCl

**Aufreinigung T7 RNA Polymerase***Lysepuffer*

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

500 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

10 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol*Waschpuffer I*

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

500 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

25 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

*Waschpuffer II*

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

25 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

*Elutionspuffer*

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

200 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

*Lagerpuffer*

40 mM Tris-Cl (pH 8,0)

100 mM NaCl

50 % (v/v) Glycerin

10 mM DTT

1 mM EDTA

0,1 % Triton X-100

**Aufreinigung RNase Inhibitor***Lysepuffer*

25 mM Tris-Cl (pH 7,5)

500 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

10 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol*Waschpuffer I*

25 mM Tris-Cl (pH 7,5)

500 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

20 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol*Waschpuffer II*

25 mM Tris-Cl (pH 7,5)

300 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

20 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol*Elutionspuffer*

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

200 mM Imidazol

5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol*Lagerpuffer*

25 mM Tris-Cl (pH 7,5)

100 mM KCl

50 % (v/v) Glycerin

10 mM DTT

**Western Blot**

*PBS (10X) 1l*

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

*PBS/ Tween*

0,1 % Tween in 1x PBS

*PBSM*

3 % Milchpulver in 1x PBS

*PBSM/ BSA*

1 % BSA & 5 % Milchpulver in 1 X PBS

*PBSM/ Tween*

0,1 % Tween in 3 % PBSM

*Transferpuffer (10X)*

30 mM Tris (pH 8,0)

130 mM Glycin

pH 7,5

*Transferpuffer*

1X Transferpuffer

20 % Methanol

0,25 g SDS

**Chaperon-Reaktionspuffer (10x)**

200 mM HEPES (pH 7,6)

10 mM EDTA (pH 8,0)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM DTT

1 % (v/v) Triton X-100

**FBA-Reaktionspuffer (10x)**

200 mM Tris-Cl (pH 7,5)

60 mM NaCl

50 mM β-Mercaptoethanol

10 mM EDTA

**Stopp-Reagenz (2x)**

0,13 % SDS

10 % Ficoll

0,13 % XC

0,13 % BB

**RT-Reaktionspuffer (10x** (Das und Georgiadis, 2001))

100 mM KCl

100 mM MgCl<sub>2</sub>

500 mM Tris pH 7.5

50 mM DTT

Alle autoklavierfähigen Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar, oder gegebenenfalls mittels Filtration (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert.

### 2.1.3 Medien

Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, oder bei kleinen Volumina durch Filtration sterilisiert.

<b>LB-Medium</b>	<b>LB-Agar</b>	<b>TSB-Medium</b>
5 g/l Hefeextrakt	5 g/l Hefeextrakt	5 ml 2x LB
10 g/l Tryptophan	10 g/l Tryptophan	10 % PEG 3350
5 g/l NaCl	5 g/l NaCl	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	15 g Bactoagar	10 mM MgSO <sub>4</sub>
		5% DMSO

Nach der Sterilisation wurden, falls benötigt, Antibiotika hinzugefügt. Hierbei wurde Ampicillin mit einer Arbeitskonzentration von 100 µg/ml, sowie Kanamycin mit einer Arbeitskonzentration von 30 µg/ml verwendet.

## 2.1.4 Konstrukte

In Tabelle 2 sind die Konstrukte sowie ihre Verwendung in dieser Arbeit aufgeführt. Dazugehörige Vektorkarten sind im Anhang dargestellt.

**Tabelle 2: Verwendete Konstrukte, Daten und Verwendungszweck**

Plasmid-bezeichnung	Insert kodiert für	Organismus Element	Plasmidgröße	Größe Protein bzw. transkribierte RNA	6x His-Tag
pKH3	<i>Nostoc</i> RT	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	6759 bp	42,7 kDa	N-Terminus
pKH4	<i>Bordetella</i> -Phage BPP-1 RT	<i>Bordetella</i> -Phage BPP-1, DGR	6698 bp	41 kDa	N-Terminus
pSD08	M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus	unbekannt	75 kDa	vorhanden
pSD84	T7 RNA Polymerase	T7 RNA Polymerase mit P266L Mutation	unbekannt	75 kDa	vorhanden
pSD91	Rat Lung RNase Inhibitor	<i>Rattus norvegicus</i>	unbekannt	50 kDa	N-Terminus
pTS18	<i>Taq</i> RT	<i>Thermus aquaticus</i>	6627 bp	36,9 kDa	N-Terminus
pTS19	Vibrio RT	Vibrio Phage VHML	6612 bp	36,1 kDa	N-terminal
pTS20	<i>Nostoc</i> RT	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	6759 bp	41,7 kDa	N-Terminus
pTS21	<i>Taq</i> RT	<i>Thermus aquaticus</i>	6291 bp	36,9 kDa	C-Terminus
pTS22	Vibrio RT	Vibrio Phage VHML	6276 bp	36,1 kDa	C-Terminus
pTS23	<i>Nostoc</i> RT	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	6423 bp	42,7 kDa	C-Terminus
pTS26	<i>Nostoc</i> RT	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	6291 bp	41,7 kDa	-
pTS30	<i>Bordetella</i> -Phage BPP-1 RT	<i>Bordetella</i> -Phage BPP-1, DGR	6698 bp	41 kDa	N-Terminus
pTS31	nAvd	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	5576 bp	14,55 kDa	C-Terminus
pUC19	kein Insert → endogene <i>E. coli</i> Proteine	-	2686 bp		

Plasmide für *In-vitro*-Transkription / RNA Herstellung

pKH2	TR-RNA	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	3483 bp	340 bp
pLM1	IMH* der TR-RNA	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120, DGR	2763	73 bp
pNZ004	Kontextfremd, 3'-UTR des UnaL2	<i>Anguilla japonica</i> , UnaL2	3020 bp	327 bp

## 2.1.5 Stämme

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH5α T1R	<i>F</i> - $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rK</i> -, <i>mK</i> +) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
BL21 (DE3)	<i>F</i> - <i>ompT hsdSB(rB – mB–) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rosetta 2 (DE3)	<i>F</i> - <i>ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm</i> (DE3) <i>pRARE2 (CamR)</i>	Novagen/Merck Millipore KGaA, Darmstadt
T7 express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 <math>\Delta</math>(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
XL10-Gold ultracompetent cells.	<i>TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96relA1 lac Hte [F proAB lacIqZDM15 Tn10(Tetr) Amy Camr]</i> .	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

## 2.1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit genutzten Enzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen. Ausnahmen sind in Tabelle 4 dargestellt. Details über die entsprechenden Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 4: Genutzte Enzyme, welche nicht von NEB bezogen wurden

Enzyme	Hersteller
<i>DpnI</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase	Abt. Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern
MyTaq DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
<i>Pfu</i> Ultra HF DNA Polymerase	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Rat Lung RNase Inhibitor	Abt. Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern
T7 RNA Polymerase	Abt. Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern

### 2.1.7 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
mouse anti-His Epitop-Tag mAb	Dianova GmbH, Hamburg

### 2.1.8 Radiochemikalien

Tabelle 6: Verwendete Radiochemikalien

Radiochemikalie	Hersteller
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Adenosintriphosphat	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Deoxycytosintriphosphat	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-Adenosintriphosphat	PerkinElmer Inc, Rodgau

### 2.1.9 Größenstandards für DNA- und Proteinarbeiten

Tabelle 7: Verwendete Größenstandards und Marker

Größenstandards /Marker	Hersteller
DNA Ladder 100 bp	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot
ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

## 2.1.10 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ECL Plus Western Blotting Detection System Kit	GE Healthcare Life Science GmbH, Freiburg
GeneArt Seamless Cloning & Assembly Kit	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
HiYield Plasmid Mini-Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PureLink® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen NV, Hilden
QuikChange® II XL Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

## 2.1.11 Geräte

Tabelle 9: Wichtigste Geräte

Gerät	Hersteller
Cyclone Phosphor Imager	PerkinElmer Inc, Rodgau
Dot Blot 96 System	Biometra/Analytic Jena AG, Jena
Gel iX Imager Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Geltrockner	VWR
Innova Incubation Shaker 44/44R	New Brunswick/Eppendorf AG, Hamburg
Qubit® 1.0 Fluorometer	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kühlbodenzentrifuge RC5B	Sorvall/Heraeus/Thermo Scientific, Dreieich
Kühlmikrozentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühltischzentrifuge Z383K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
MaxQ4000 Incubation Shaker	Thermo Scientific, Dreieich
Membranpumpe MZ 2C NT +2AK	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vertikalgelelektrophoresesystem	
MyCycler Thermocycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
peqSTAR 2x Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sonopuls HD 2200 Ultraschallhomogenisator	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin

### **2.1.12 Software**

In dieser Arbeit wurden diverse Computerprogramme zur Auswertung der Daten genutzt wie ImageJ (NIH) oder ImageQuantTL (GE Healthcare Life Science GmbH, Freiburg).

### **2.1.13 Diverses**

Für die Proteinaufreinigungen wurden Protino Ni-NTA-Agarose (Macherei-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und Heparin-Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. Für die Analyse des Bindungsverhaltens der nAvd wurden Hybond ECL Nitrocellulosemembran und Hybond N+ Nylonmembran (Amersham/GE Healthcare Life Science GmbH, Freiburg) und für die Aktivitätsstudien der nRT wurde Grade DE81 Ion Exchange Paper (GE Healthcare Life Science GmbH, Freiburg) verwendet.

## **2.2 Methoden**

Im Folgenden werden diverse Methoden erläutert, die zur Vervielfältigung und Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen sowie zur Charakterisierung von Enzymen genutzt wurden.

### **2.2.1 Analytische Methoden**

#### ***2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese***

Zum Auftrennen verschiedener Nukleinsäure -Fragmente von 0,5 bis 25 Kilobasenpaaren (kb) nach ihrer Größe wird die Agarosegelelektrophorese genutzt. Hierbei bildet Agarose abhängig von ihrer Konzentration ein Netz aus, welches die verschieden großen Nuklein-Fragmente nach Anlegung eines elektrischen Feldes unterschiedlich schnell durchwandern. Zum Herstellen eines 1 % Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1-fach TAE-Puffer (2.1.2.1) aufgekocht und nach Abkühlen mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm eingeführt. Nach Aushärten des Agarosegels wurde dieses mit den Proben beladen und als Größenstandard wurden je 5 µl 1 kb bzw. 100 bp Marker (Tabelle 7) auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 100-120 V für 20 bis 45 Minuten in 1-fach TAE-Puffer durchgeführt und die Banden anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

### ***2.2.1.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)***

Um kleinere Nukleinsäure -Fragmente bis zu 1 kb ihrer Größe nach aufzutrennen macht man sich die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zunutze. Diese beruht auf denselben Prinzipien wie die Agarosegelelektrophorese, jedoch wird statt Agarose Polyacrylamid benutzt, welches feinere Poren formt. Um einzelsträngige und doppelsträngige Nukleinsäuren in ihrer nativen Struktur zu analysieren wurde die native PAGE angewandt. Hierzu wurden 40% Acrylamide / Bisacrylamide (Ratio 29:1) in gewünschter Prozentigkeit in 1-fach TBE gegeben. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,05 %) wurde die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten gespritzt und ein Kamm eingeführt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in 1-fach TBE für mindestens 1 Stunde bei 8-10 W laufen gelassen, um das Gel zu equilibrieren. Nach dem Beladen des Gels lief es weitere 2-3 Stunden bei 8-10 W je nach Fragmentgröße. Anschließend wurde das Gel unter Vakuum und 80 °C für 25 Minuten getrocknet.

Bei der Analyse von radioaktiven Proben konnten die radioaktiven Signale mittels Phosphorimager Screens und dem Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) detektiert werden. Die Quantifizierung der Intensitäten erfolgte mithilfe des Computerprogrammes ImageQuant TL (GE Healthcare).

### ***2.2.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)***

Zur Analyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Erhitzen der Proben ist es möglich Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen, unabhängig ihrer Ladung in nativem Zustand. Diskontinuierliche SDS-Gele bestehen aus einem Sammelgel, welches einen niedrigeren Acrylamidgehalt und einen niedrigeren pH-Wert besitzt im Vergleich zum Trenngel, welches einen Acrylamidgehalt von 8-15 % aufweist. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels können Punkt 2.1.2.2 entnommen werden.

Zum Beladen wurden die Proteinproben mit SDS-Ladepuffer (2.1.2.2) versetzt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die aufgetragenen Volumina können Tabelle 10 entnommen werden. Zudem wurden je 7 µl Proteinmarker (Tabelle 7) als Größenstandard aufgetragen.

Tabelle 10: Auf SDS-Gele aufgetragene Probenvolumina

	Proben	Aufgetragene Volumina [ $\mu$ l]
Expression	Vor-Induktion (VI)	5
	Nach-Induktion (NI)	5
	Lyseüberstand (LÜ)	10
	Lysepellet(LP)	5
Aufreinigung	Durchfluss (DS)	10
	Waschfraktionen (W)	10
	Elutionsfraktionen (E)	10
	Säulenproben (S)	10
Dialyse	Dialyseüberstand (DÜ)	10
	Dialysepellet (DP)	5

Die SDS-PAGE wurde bei 100-120 V für 45 bis 90 Minuten in 1-fach Laufpuffer (2.1.2) durchgeführt. Die im Gel befindlichen Proteine wurden mittels Coomassie Brillant Blue R-250 angefärbt und das Gel anschließend mit Entfärberlösung entfärbt (2.1.2.2).

#### **2.2.1.4 Western Blot**

Eine Nachweismethode für Proteine ist der Western Blot. Hierbei werden Proteine von einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen und mittels Immunmarkierung detektiert. Dazu wurde das SDS-Gel nach durchgeführter SDS-PAGE durch das Tank Blot-Modul des Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Systems auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Transfermembran) bei 4 °C und 15 V über Nacht übertragen. Nach der Übertragung wurde die PVDF-Transfermembran für 5 Minuten mit 1-fach PBS gewaschen und unspezifische Bindestellen durch eine Inkubation mit PBSM/ BSA für eine Stunde geblockt. Die PVDF-Transfermembran wurde erneut mit 1-fach PBS gewaschen bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 5) für 2 Stunden folgte. Es schlossen sich Waschschrte mit PBSM für 5 Minuten, zweimal PBSM/ Tween für je 10 Minuten und PBSM für 5 Minuten an. Nun folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 5) für eine Stunde. Die Membran wurde anschließend mit 1-fach PBS für 10 Minuten, zweimal mit PBS /Tween für je 10 Minuten und 1-fach PBS für 10 Minuten gewaschen. Direkt im Anschluss erfolgte die Detektion mit dem ECL Plus Western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare) auf einem Röntgenfilm. Zum Entwickeln des Röntgenfilms

wurden der Entwickler G 153 und der Fixierer G354 von AGFA benutzt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## **2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

In diesem Abschnitt sind die verschiedenen Methoden aufgelistet, die unter anderen zur Erzeugung und Aufreinigung von Nukleinsäuren genutzt wurden.

### ***2.2.2.1 Plasmidpräparation, Fällung und Phenol-Chloroform-Extraktion***

Die Präparation von Plasmiden wurde entweder mittels kommerzieller Kits (Tabelle 8) oder alkalischer Lyse durchgeführt. Bei der Verwendung kommerzieller Kits, welche auf dem Prinzip der Säulenaufreinigung basieren, wurden die Herstelleranweisungen befolgt. Bei der alkalischen Lyse wurde eine dicht bewachsene Über-Nacht-Kultur (ÜN-Kultur) abzentrifugiert und das Pellet in Lösung 1 resuspendiert. Nach der Zugabe von Lösung 2, welche die Lyse initiiert, wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und bei Raumtemperatur maximal 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Lösung 3 zur Neutralisierung hinzugefügt, welcher eine Inkubation von 3-5 Minuten auf Eis folgte (Verhältnis der Lösungen 1/2/3: 1:2:1,5). Nun folgte eine Zentrifugation bei Höchstgeschwindigkeit um chromosomale DNA, Proteine und andere Zellbestände von der Plasmid-DNA zu trennen, welche sich nach der Zentrifugation im Überstand befand.

Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurden 0,7-faches Volumen Isopropanol bzw. 3-faches Volumen 100 %iger Ethanol und 300 mM NaAc (pH 5,2) zu den Proben gegeben, dieses inkubiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Gewaschen wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol, welcher ebenfalls nach einer Zentrifugation mit dem Überstand verworfen wurde. Das trockene Pellet wurde in H<sub>2</sub>O gelöst.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurde 1-faches Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0) zu den Proben gegeben, gründlich vermischt und anschließend zentrifugiert, sodass die obere Phase mit der enthaltenen DNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Dieser Schritt kann so oft wiederholt werden, bis die gewünschte Reinheit erreicht ist. Anschließend wurde erneut eine Fällung durchgeführt.

### **2.2.2.2 Plasmid-Transformation in *E. coli***

Mittels der KCM-Methode wurden verschiedene DNA-Plasmide in kompetente *E. coli* Stämme (Tabelle 3) transformiert.

Zur Herstellung KCM-kompetenter Zellen wurde mit einer dicht bewachsenen Vorkultur LB-Medium angeimpft (1:100) und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,5-0,6 bei 37 °C und 200 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in eiskaltem TSB-Puffer (7,5 ml / 100 ml Kultur) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 60 Minuten. Die Kulturen wurden zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die KCM-Transformation wurden 10 ng Plasmid-DNA mit 1-fach KCM und 100 µl kompetenten Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 ml LB Medium zum Ansatz gegeben und bei 37 °C und 200 rpm für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen, abhängig ihrer Resistenz, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Um kleinere einzelsträngige Nukleinsäure-Fragmente bis zu 1 kb aufzutrennen eignet sich die denaturierende PAGE besonders, da sie durch eine hohe Urea-Konzentration die sekundären DNA-Strukturen zerstört. Hierzu wurden 8 M Urea und 40% Acrylamide / Bisacrylamide (Ratio 29:1) in gewünschter Prozentigkeit in 1-fach TBE gelöst und steril gefiltert. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,05 %) wurde die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten gespritzt und ein Kamm eingeführt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in 1-fach TBE für mindestens 1 Stunde bei 12-24 W laufen gelassen, um das Gel zu equilibrieren. Die Proben wurden vor dem Beladen mit Urea-Ladepuffer (1:1; vgl. 2.1.2.1) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach dem Beladen des Gels lief es weitere 3-4 Stunden bei 12-24 W je nach Fragmentgröße.

Diese Methode wurde vor allem zur Aufreinigung von Oligonukleotiden in voller Länge und RNA nach abgeschlossener *in-vitro*-Transkription zum Entfernen des DNA-Templates durchgeführt. Dazu wurden die Banden von Interesse mittels UV-Shadowing sichtbar gemacht und aus dem Gel geschnitten. Zum Aufbrechen des Gels wurde das Gelstück durch eine Spritze gedrückt, in 3-faches Volumen

Elutionspuffer gegeben, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei 4 °C rollend eluiert (Elution von DNA über Nacht, RNA 3 Stunden). Im Folgenden wurden die im Elutionspuffer befindlichen Nucleinsäuren mittels eines 0,4 µm Filter von den Gelstücken getrennt, gefällt (2.2.2.1), und anschließend in H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration ermittelt (2.2.2.5).

#### **2.2.2.4 Fluorometrische Quantifizierung von Nucleinsäuren**

Zur Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren bis zu einer Konzentration von 1 µg/µl wurde das Qubit® System von Invitrogen/Life Technologies GmbH Darmstadt genutzt. Zur Quantifizierung von DNA wurde das Qubit® DNA BR Assay-Kit verwendet; zur Quantifizierung von RNA wurde das Qubit® RNA Assay-Kit genutzt. Hierzu wurde zu 198 µl entsprechendem Puffer und 1 µl Farbstoff je 1 µl Probe gegeben, vermischt und im Dunklen bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration mittels Qubit® errechnet.

#### **2.2.2.5 Spektrometrische Quantifizierung von Nucleinsäuren**

Zur Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren über 1 µg/µl wurde das Spektrometer (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und mittels Lambert-Beer'schem Gesetz die Konzentration errechnet:

$$A_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \text{wobei} \quad d = \text{Schichtdicke, } A = \text{Absorption/ optische Dichte,} \\ c = \text{Konzentration, } \epsilon = \text{Extinktionskoeffizient}$$

Zur spezifischen Ermittlung des Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nucleinsäuren wurden folgende Formeln verwendet:

$$\epsilon (\text{DNA}) = 0,9 \cdot ([\text{Anzahl A} \cdot 15,4] + [\text{Anzahl G} \cdot 11,5] + [\text{Anzahl C} \cdot 7,3] + [\text{Anzahl T} \cdot 8,8])$$

$$\epsilon (\text{RNA}) = 0,9 \cdot ([\text{Anzahl A} \cdot 15,4] + [\text{Anzahl G} \cdot 11,5] + [\text{Anzahl C} \cdot 7,2] + [\text{Anzahl U} \cdot 9,9])$$

([www.purimex.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=20&Itemid=8&lang=de](http://www.purimex.com/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=8&lang=de))

#### **2.2.2.6 Radioaktive Endmarkierung von Oligonucleotiden**

Aufgereinigte Oligonucleotide (2.2.2.3) wurden durch radioaktive Endmarkierung (Endlabeling) mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP markiert. Hierzu wurden in einem 15 µl Gesamtvolumen 1 µl 10 µM Oligonucleotide

(Endkonzentration 0,66  $\mu\text{M}$ ), 15 Units (U) T4 Polynucleotidkinase (PNK, NEB) und 15  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (Perkin Elmer) in 1-fach PNK-Puffer (NEB) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nicht inkorporierte Nukleotide mittels QIAquick Nucleotide Removal Kits (Tabelle 8) entfernt.

### **2.2.2.7 Herstellung von Nukleinsäure-Duplices**

Zur Erzeugung von DNA-Duplices wurde ein Strang radioaktiv markiert (2.2.2.6) und mit dem komplementären nicht markierten Strang im Verhältnis 1:2 in 1-fach Annealing-Puffer gemischt. Für RNA/DNA-Duplices wurden, unabhängig, ob ein Strang radioaktiv markiert wurde, RNA und DNA im Verhältnis 1:3 in 1-fach Annealing-Puffer gemischt. Die Ansätze wurden für 1 Minute bei 95 °C inkubiert und anschließend im Heizblock auf unter 30 °C abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.2.8 *in vitro* Transkription**

In dieser Arbeit wurde die sogenannte „run-off Transkription“ durchgeführt. Hierbei wird das Templatplasmid vor der tatsächlichen *in vitro* Transkription (IVT) durch einen *Hind*III Verdau linearisiert. Da sich die *Hind*III-Schnittstelle in dem Plasmid direkt hinter der zu transkribierenden Sequenz befindet, fällt die T7 Polymerase nach der Synthese der Sequenz von dem Templat ab. Als Templat wurden das DGR kontextfremde Plasmid pNZ004 und pKH2, welches für die TR-RNA des *Nostoc* DGRs kodiert (Tabelle 2), verwendet.

Diesbezüglich wurden 100  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 120 U *Hind*III-HF (NEB) in 1-fach Puffer 4 (NEB) für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 80 °C für 20 Minuten gestoppt. Es folgte eine Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.1).

Nach erfolgreicher Linearisierung folgte die IVT-Reaktion in 500  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Darin lagen 10  $\mu\text{g}$  lineare Plasmid-DNA, RNase Inhibitor (Tabelle 4, 1:50), 10 mM DTT, 16 nM NTPs und T7-RNA Polymerase (Tabelle 4, 1:25) in 1-fach *in vitro* Transkriptionspuffer (2.1.2.1), vor. Die Menge der einzelnen eingesetzten NTPs wurde an die zu transkribierende RNA Sequenz angepasst, dabei betrug die Endkonzentration der vier NTPs zusammen 16 nM. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C. Es folgte eine Zentrifugation des Reaktionsansatzes bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 2 Minuten, sodass sich das während der Transkription gebildete Pyrophosphat absetzen konnte. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und die RNA gefällt und gewaschen (2.2.2.1). Zur Entfernung des DNA-Templats wurde die RNA mittels 5 %iger

denaturierender PAGE aufgereinigt (2.2.2.3). Es folgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Spektrometer (2.2.2.5). Die RNA wurde im Anschluss bei -20 °C bzw. - 80 °C gelagert.

### 2.2.2.9 Ortsspezifische Mutagenese

Um Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzufügen wurde die ortsspezifische Mutagenese (auch Site Directed Mutagenesis) angewandt. Diesbezüglich wurde das QuikChange® II XL Site Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Tabelle 8) genutzt und den Herstelleranweisungen Folge geleistet. Hierzu wurden entsprechende Primer erstellt, welche die gewünschte Mutation enthielten (Tabelle 11). Mit diesen wurde eine PCR mit der *Pfu*Ultra HF DNA Polymerase und ein *Dpn*I Verdau, mit welchem die methylierte Templat-DNA verdaut wurde, durchgeführt. Teilproben der Mutagenese-Ansätze wurden mittels 1 %iger Agarosegelelektrophorese (2.2.1.1) analysiert. Nach Transformation der Mutagenese-Ansätze in *XL10-Gold ultracompetent cell* und anschließender Plasmidpräparation (2.2.2.1) wurden die DNA-Sequenzen sequenziert (LGC Genomics) und mit dem Programm SeqMan (Lasergene)abschließend analysiert.

**Tabelle 11:Primersequenzen für die ortsspezifische Mutagenese der bRT und nRT**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
KH1	CGACTCACTTCCTGAAAAGCCAgTTTTCCAAGTTCTTTCC	bRT D138Q (forward)
KH2	GGAAAGAAGTTGGAAAACtGCTTTTTcAGGAAGTGAGTCG	bRT D138Q (reverse)
KH3	CGTACGTTCTGCAATGCcAgATCCGTAAGTACTTCCCATC	nRT D135Q (forward)
KH4	GATGGGAAGTACTTACGGATcTgGCATTGCAGAACGTACG	nRT D135Q (reverse)

## 2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

Im Folgenden sind verschiedene Methoden beschrieben, die zur Überexpression, Aufreinigung und Dialyse rekombinanter Proteine verwendet wurden, sowie diverse Charakterisierungsversuche.

### 2.2.3.1 Überexpression rekombinanter Proteine und Zellyse

#### Native Zellyse

Eine Vorkultur wurde mit transformierten Zellen (2.2.2.2) in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt und ÜN bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Diese dicht bewachsene Kultur

wurde in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft, sodass eine optische Dicht bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,05-0,08 erreicht wurde. Die Kultur wurde erneut bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,7 mit 100  $\mu$ M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und anschließend ÜN bei 16 °C und 200 rpm durchgeführt. Vor dem Induzieren wurde eine Probe der Kultur (vor Induktionsprobe: VI-Probe) zum späteren Vergleich genommen, welche pelletiert und bei -20 °C gelagert wurde. Vor der Zellernte am nächsten Tag wurde die  $OD_{600}$  der Kultur erneut bestimmt und eine Probe (nach Induktionsprobe: NI-Probe) genommen. Die restliche Kultur wurde bei 4 °C und 6000 g für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in Lysepuffer (2.1.2.2; RT Lysepuffervolumen: Kulturvolumen 1:75; nAvd Lysepuffervolumen: Kulturvolumen 1:30) resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung (Bandelin HD 2200 Ultraschallhomogenisator mit KE76-Sonotrode) lysiert. BL21 Zellen, welche zur Expression der RTs verwendet wurden, wurden 2 \* 30 Sekunden mit 5x Puls und ca. 50 % Output auf Eis lysiert, während T7 Express Zellen zur Expression der nAvd 7 \* 10 Sekunden mit 5x Puls und etwa 50 % Output behandelt wurden. Zwischen dem 6ten und 7ten Durchgang wurde zehn Minuten pausiert, sodass die Proteine nicht durch aufkommende Hitze denaturiert wurden. Anschließend wurden die lysierten Proben bei 16.100 rcf und 4 °C für mindestens 60 Minuten zentrifugiert. Pellets und Überstand der Proben wurden getrennt und Teilproben zur Analyse mittel SDS-PAGE (2.2.1.3) abgenommen, während der Rest bei 4 °C gelagert wurde. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die löslichen Proteine im Überstand, während sich die ausgefallenen Proteine im Pellet befinden.

Neben der nAvd aus *Nostoc sp.* PCC 7120 und den RTs aus *Nostoc sp.* PCC 7120, *Thermus aquaticus* sowie dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) wurden zwei weitere Proteine erzeugt, die für unterschiedliche Versuche verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um einen *Rat Lung* RNase Inhibitor (pSD91), dessen Expression in *E. coli* Rosetta II Zellen (DE3) mit 0,4 mM IPTG induziert wurde. Die Expression erfolgte bei 37 °C und 200 rpm für 4 h. Zudem erfolgte die Expression der T7 Polymerase (pSD84) in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und verlief bei 37 °C und 200 rpm über Nacht.

### Denaturierende Zellyse

Nach der nativen Zellyse lag ein großer Teil der RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 im denaturierten Zustand vor. Daher wurde die Zellyse denaturierend durchgeführt, um die RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 in weiterführenden Versuchen denaturierend aufzureinigen. Diese Methode entspricht in der

Durchführung der nativen Methode bis zur Zellernte. Anschließend wurden 8 M Harnstoff als Denaturierungsmittel verwendet. Das Bakterienpellet nach der Zellernte wurde in NPI-10 Puffer resuspendiert (Puffervolumen: Kulturvolumen 1:75) und es wurden 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt. Es folgten eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten und die Zelllyse mittels Ultraschallbehandlung (Bandelin HD 2200 Ultraschallhomogenisator mit KE76-Sonotrode) mit 2 \* 30 Sekunden mit 5x Puls und ca. 50 % Output auf Eis. Die lysierten Zellen wurden bei 10.000 rcf und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert und Überstand (Ü1) und Pellet getrennt. Es wurden Teilproben zur späteren SDS-PAGE Analyse genommen. Im weiteren Verlauf wurde mit dem Zellpellet gearbeitet. Das Pellet wurde in NPI-10 Puffer resuspendiert und erneut bei 10000 rcf und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Ü2) wurde abgenommen und für spätere SDS-PAGE Analysen aufbewahrt. Das Pellet wurde nun in DNPI-10 (mit 8 M Harnstoff, Volumenverhältnis DNPI-10:NPI-10 1:2,5; 2.1.2.2) resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10000 rcf und Raumtemperatur für 30 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die denaturierten Proteine von Interesse im Überstand (Ü3). Es wurden Teilproben des Überstands und Pellets für SDS-PAGE Analysen genommen. Alle Teilproben wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE analysiert (2.2.1.3).

### ***2.2.3.2 Proteinaufreinigung und Dialyse***

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Proteinaufreinigung angewendet, die im Folgenden erläutert werden.

#### Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA

Proteine, die an einen 6x Histidin-Tag (6x His-Tag) fusioniert sind, wurden mittels Nickel-Nitrolessigsäure (Ni-NTA) Komplex (HisPurNi-NTA Resin von Thermo Fisher Scientific) über Polypropylen Säulen aufgereinigt. Hierbei geht der 6x His-Tag eine reversible Bindung mit den Nickel-Ionen ein, welche über hohe Imidazolkonzentrationen gelöst werden kann. Somit können Proteine mit 6x His-Tag von anderen endogenen Proteinen gereinigt werden.

Dazu wurden Polypropylen Säulen und Nickelmatrix zusammen mit 10-fachem Säulenvolumen Lysepuffer (2.1.2.2, ohne Proteaseinhibitor) equilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Proteinlysats ebenfalls auf die Polypropylen Säulen gegeben und für 1-2 Stunden bei 4 °C rollend inkubiert. Die Säule wurde aufgerichtet und der Durchfluss in einem 15 ml Gefäß aufgefangen. Es folgten Waschschrte und Elutionsschritte, bei welchen die Säule von schwach gebundenen Proteinen gewaschen und anschließend die starkgebundenen Proteine eluiert wurden. Da für RT und nAvd

verschiedene Puffer und Volumina verwendet wurden, ist in Tabelle 12 die genauere Durchführung angegeben. Alle Proben wurden in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen. Zur Überprüfung, ob die Proteine von Interesse noch an das Säulenmaterial gebunden waren, wurde zum Schluss ebenfalls eine Probe des Säulenmaterials genommen. Zudem wurden von allen Fraktionen Teilproben zur späteren Analyse mittel SDS-PAGE entnommen.

**Tabelle 12: Puffer, Volumina und Wiederholung der einzelnen Wasch- und Elutionsschritte für RT und nAvd**

	RT	nAvd
Waschschritte	2x 1-faches Probenvolumen (4 ml) des RT-Waschpuffers (20 mM Imidazol, 2.1.2.2)	1x 25-faches Bettvolumen (25 ml) des nAvd-Waschpuffers (100 mM Imidazol, 2.1.2.2). Vor dem Durchlauf der letzten 5 ml wurde die Säule erneut verschlossen und für 5 Minuten rollend inkubiert.
Elutionsschritte	Je 1/8 Probenvolumen (500 µl) der 3 verschiedenen RT-Elutionspuffer mit aufsteigender Imidazolkonzentration (250 mM, 350 mM, 500 mM) 2x Elutionspuffer I, 2x Elutionspuffer II, 1x Elutionspuffer III (2.1.2.2).	7x 1-faches Bettvolumen (500 µl) des nAvd-Elutionspuffers (500 mM Imidazol, 2.1.2.2).

### Proteinaufreinigung mittels Heparin-Agarose

Eine weitere angewendete Aufreinigungsmethode ist die Heparin-Agarose Affinitätschromatographie mit welcher u.a. Lipoproteine, DNA-bindende Proteine oder Proteinsynthese-Faktoren aufgereinigt werden können. Diese Methode wurde genutzt, um die RT über ihre Nukleinsäure-Bindestellen an das Heparin zu binden. Diese Bindung ist reversibel und kann durch verschiedene Salzkonzentrationen gelöst werden.

Diesbezüglich wurden Polypropylen Säulen und die Heparin-Agarose zusammen mit 10-fachem Säulenvolumen Lysepuffer (2.1.2.2, ohne Proteaseinhibitor) equilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Proteinlysats ebenfalls auf die Polypropylen Säulen gegeben und für 3-4 Stunden bei 4 °C rollend inkubiert. Die Säule wurde aufgerichtet und der Durchfluss in einem 15 ml Gefäß aufgefangen. Es folgten zwei Waschschritte mit Heparin-Waschpuffer (10-faches Bettvolumen, 10 ml) und die Elution der Proteine in 10 Elutionsschritten. Dazu wurden die Heparin-Elutionspuffer I-V mit steigender NaCl-Konzentration, 0,75 M bis 5 M, je zweimal appliziert (je 1/3 Bettvolumen, 330 µl;

2.1.2.2) und die einzelnen Fraktionen in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Zum Schluss wurde ebenfalls eine Probe des Säulenmaterials genommen, um zu überprüfen, ob die Proteine von Interesse noch daran gebunden waren. Es wurden von allen Fraktionen Teilproben genommen, welche mittels SDS-PAGE (2.2.1.3) analysiert wurden.

#### Aufreinigung thermostabiler Proteine

Thermostabile Proteine, zum Beispiel aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, können über Erhitzen von anderen, thermoinstabilen Proteinen getrennt werden. Hierzu wurde das Proteingemisch für 15 Minuten bei 75 °C inkubiert und anschließend bei 123000 rcf und 4 °C für 60 Minuten zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden getrennt und die beiden Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.1.3). Die nativen Proteine befinden sich zu diesem Zeitpunkt im Überstand, während die durch das Erhitzen denaturierten Proteine im Pellet sind.

#### Denaturierende Proteinaufreinigung und Renaturierung mittels Dialyse

Zur Aufreinigung denaturierter Proteine wurde der Überstand 3 (Ü3) der denaturierenden Lyse (2.2.3.1) mit Nickel-NTA inkubiert. Diese Methode ist der nativen Aufreinigung über Nickel-NTA ähnlich (2.2.3.2), jedoch wurden andere Puffer verwendet. Für das Equilibrieren der Ni-NTA und Säule wurde 10-faches Volumen DNPI-10 Puffer verwendet. Zum Waschen wurde in zwei Schritten je 10-faches Volumen DNPI-20 verwendet. Eluiert wurde im 5-fachen Volumen zweifach in DNPI-250, einfach in DPNI-350 und anschließend zweifach in DNPI-500. Ein Teil der Säule wurde in DNPI-500 aufgenommen. Von allen Fraktionen wurden Teilproben genommen, welche mittels SDS-PAGE (2.2.1.3) analysiert wurden.

Um denaturierte Proteine rückzufalten, wurden Renaturierungsversuche mittels Dialyse durchgeführt. Hierbei wird bei jedem Dialyseschritt die Harnstoffkonzentration schrittweise herabgesetzt, bis sich die Proteine wieder in native Form falten können. Dazu wurden die Proteine im Dialyseschlauch (MWCO: 12000-14000) jeweils 12 Stunden bei 60 rpm und 4 °C in verschiedenen Dialysepuffern mit 6 M, 4 M, 2 M, 1 M und schließlich ohne Harnstoff inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 16100 rcf für mindestens 60 Minuten zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich lösliche Proteine im Überstand, während ausgefallene Proteine im Pellet zu finden sind. Anschließend wurden Pellet und Überstand getrennt und Teilproben mittels SDS-PAGE (2.2.1.3) analysiert.

## Dialyse

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung und die Analyse, in welcher Fraktion sich das Protein von Interesse befand, wurden diese Fraktionen in Lagerpuffer (2.1.2.2) dialysiert. Dazu wurden die Proteine in einen geeigneten Dialyseschlauch (MWCO: 12000-14000 für RTs bzw. MWCO 6000-8000 für nAvd; ZelluTrans/Roth) überführt und über Nacht bei 4 °C und 60 rpm in 200-faches Probenvolumen Dialysepuffer dialysiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine auf dem Dialyseschlauch in Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 16100 rcf für mindestens 60 Minuten zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich lösliche Proteine im Überstand, während ausgefallene Proteine im Pellet zu finden sind. Anschließend wurden Pellet und Überstand getrennt und Teilproben mittels SDS-PAGE (2.2.1.3) analysiert.

### **2.2.3.3 Fluorometrische Quantifizierung von Proteinen**

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde das Qubit® System von Invitrogen/Life Technologies GmbH Darmstadt mit dem Qubit® Protein Assay-Kit genutzt. Hierzu wurde zu je 198 µl Puffer und 1 µl Farbstoff 1 µl Probe gegeben, vermischt und im Dunklen bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration mittel Qubit® errechnet.

## **2.2.4 Methoden zur Charakterisierung der RT *Nostoc sp.* PCC 7120**

Im Folgenden sind diverse Methoden zur Analyse der Proteine RT und nAvd aus *Nostoc sp.* PCC 7120 ausführlich erläutert.

### **2.2.4.1 Aktivitätsassay der RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120**

Die Aktivitätsassays der reversen Transkriptasen wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Darin enthalten waren 1-fach RT-Reaktionspuffer, RNA/Primer Duplex (1 µM / 3 µM), 0,5 mM dNTPs, 50 µM DTT, 0,25 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Hartmann Analytic) und RNase Inhibitor (1:20). Die Proteine wurden in 50 % Glycerol gelagert und 1: 10 in die Reaktion gegeben, sodass die finale Glycerolkonzentration in der Reaktion 5% betrug. Die Reaktion inkubierte bei 37 °C für 1,5 Stunden. Anschließend wurden 5 µl der Reaktion auf DE81-Filterscheiben (Whatman) aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membranen wurden je 5-mal mit 50 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gewaschen. Jede Inkubation dauerte 4-5 Minuten. Diese Membranen binden vor allem

höhermolekulare Nukleinsäuren, während einzelne Nukleotide nicht gebunden werden. In der folgenden Szintillationsmessung der Aktivität inkorporierter dCTP-Nukleotide kann ein Rückschluss auf die RT-Aktivität in den einzelnen Reaktionen gezogen werden.

Als Positivkontrolle wurde die reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV-RT) genutzt. Als Negativkontrolle wurden anstatt der verschiedenen RTs Dialysepuffer, sowie die endogenen Proteine aus *E. coli* BL21 Zellen verwendet.

Es wurden ebenfalls RT-Assays ohne radioaktive Markierung durchgeführt. Hierbei wurde das [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP durch H<sub>2</sub>O in der Reaktion ersetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben durch nachfolgende RT-PCR weiter analysiert.

#### 2.2.4.2 RT-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In 25  $\mu$ l Reaktionsvolumen waren 1  $\mu$ l Produkt des RT-Assays sowie 1-fach MyTaq Red Reaction Buffer (Bioline), in welchem sich Farbstoff, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs befanden. Zudem waren 1,25 U MyTaq Red DNA Polymerase und je 0,5  $\mu$ M der beiden Primer (Tabelle 13) enthalten. Die PCR begann mit initialer Denaturierung bei 95 °C für eine Minute, gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Hybridisierung bei variierender Temperatur (Tabelle 13) für 15 Sekunden und Extension bei 72 °C für 10 Sekunden. Anschließend folgte eine finale Extension bei 72 °C für 10 Minuten. Das PCR-Produkt wurde zur finalen Analyse auf ein 1 %iges Agarosegel geladen (2.2.1.1) und mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

**Tabelle 13: Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen der RT-PCR**

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungstemperatur
PM145	CTTCCCTCCATTTTAGGAGAAAG	61 °C
PM151	GCTTTGTAGGGTTGAGCAACTG	63 °C
TS49	ACATTACATTACATTTATTTTCG	51 °C
NZ004	ACGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGATTAACCACCACCATTTC	72 °C

## 2.2.3 Methoden zur Charakterisierung der nAvd *Nostoc sp.* PCC 7120

### 2.2.3.1 Filter-Binding-Assay (FBA)

Da das nAvd Protein aus *Nostoc sp.* PCC 7120 befähigt ist Nukleinsäuren zu binden, wurden zu weiteren Analysen Filter-Binding-Assays (FBA) nach Wong und Lohman (Wong und Lohman, 1993) durchgeführt. Hierzu wurden in einem 12 µl Reaktionsansatz 12,5 nM Nukleinsäure-Substrat, 1-fach FBA-Reaktionspuffer (2.1.2.1) und nAvd Protein in verschiedenen Konzentrationen bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl der Reaktion auf zwei Membranen, die in der DotBlot-Apparatur (Dot Plot 96 System von Biometra) befestigt waren, aufgetragen. Die obere Nitrocellulosemembran bindet an Proteine gebundene Nukleinsäuren, während die untere Nylonmembran freie Nukleinsäuren bindet. Diese Membranen wurden zuvor in 100 ml FBA-Reaktionspuffer (2.1.2.1) equilibriert. An die DotBlot-Apparatur wurde Vakuum angelegt, sodass die aufgetragenen Proben an die Membranen gezogen und dort gebunden wurden. Anschließend wurden die Proben mit 200 ml FBA-Reaktionspuffer gewaschen. Die Membranen wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet und danach mittels Phosphorimager Screens und dem Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) analysiert. Mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ wurden die Daten ausgewertet und die prozentuale Bindung errechnet.

### 2.2.3.2 Hybridisierungsassays

Um zu überprüfen, ob die nAvd Nukleinsäurechaperonaktivität aufweist wurden Assays durchgeführt, die die Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuresubstraten untersuchten. Hierzu wurden in 10 µl Reaktionen Protein in diversen Konzentrationen, 1,8 nM radioaktiv markiertes Oligonukleotid und 36 nM nicht markiertes, komplementäres Oligonukleotid gegeben. Zudem enthielt die Reaktion 1-fach Chaperon-Reaktionspuffer (2.1.2.1). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 Minuten und wurde durch die Zugabe von 10 µl eiskaltem Stopp-Reagenz (2.1.2.1) abgestoppt. Anschließend erfolgte die Analyse über 12 %ige native PAGE (2.2.1.2). Durch Phosphorimager Screens, das Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) und das Computerprogramm ImageQuant TL (GE Healthcare) wurden die Assays abschließend quantifiziert.

### ***2.2.3.3 Strangaustauschassay***

Um zu testen, ob die nAvd Strangaustausche katalysieren kann wurden Assays durchgeführt, bei denen ein DNA-Duplex mit einem komplementären ssDNA Oligonukleotid in 50-fachem Überschuss inkubiert wurde. In der Reaktion lagen 1,6 nM radioaktiv markierte hybridisierte dsDNA Oligonukleotide (2.2.2.7), 800 nM radioaktiv markierte ssDNA, 1,33  $\mu$ M nAvd Protein, sowie 1-fach Annealing-Puffer (2.1.2.1) vor. Die Reaktionen inkubierten für je 2 bzw. 15 Minuten bei 37 °C und wurden durch die Zugabe von 10  $\mu$ l eiskaltem Stopp-Reagenz (2.1.2.1) abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels 12 %iger nativer PAGE analysiert (2.2.1.2) und durch Phosphorimager Screens, das Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) und das Computerprogramm ImageQuant TL (GE Healthcare) quantifiziert.

### ***2.2.3.3 Protein-Stabilitätsassay***

Für die Bestimmung der Proteinstabilität wurden je 20  $\mu$ l nAvd (13,33  $\mu$ M) in 5 °C Schritten von 35 °C bis 100 °C für je 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei Höchstgeschwindigkeit für 60 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Es wurden Teilproben genommen und mittels 12 %iger SDS-PAGE (2.2.1.3) analysiert. Lösliche Proteine befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Überstand, welcher in weiterführenden Nukleinsäurechaperon-Assays verwendet wurde. Durchführung und Analyse entsprechend Punkt 2.2.3.2.

### ***2.2.3.4 DNA-Stabilitätsassay***

Um den Einfluss des nAvd Proteins auf dsDNA bei Hitzestress zu untersuchen, wurden DNA-Stabilitätsassays durchgeführt. Die Reaktion enthielt 1,6 nM radioaktiv markierte hybridisierte dsDNA Oligonukleotide (2.2.2.7), 1,33  $\mu$ M nAvd Protein, sowie 1-fach Annealing-Puffer (2.1.2.1). Die Reaktionen inkubierten für je 5 Minuten bei aufsteigenden Temperaturen von 35 °C bis 100 °C und wurden durch die Zugabe von 10  $\mu$ l eiskaltem Stopp-Reagenz (2.1.2.1) abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels 12 %iger nativer PAGE analysiert (2.2.1.2) und durch Phosphorimager Screens, das Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) und das Computerprogramm ImageQuant TL (GE Healthcare) quantifiziert.

### 3. Ergebnisse

Wie schon zu Beginn dieser Arbeit dargestellt, sind viele Zusammenhänge, Funktionen und Abläufe von DGRs und deren Mechanismen noch nicht bekannt. Daher wurden im Folgenden zwei wichtige Proteine der *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR Kasette überexprimiert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Die reverse Transkriptase, nRT, wurde auf ihre Löslichkeit, Stabilität und Aktivität untersucht. Das akzessorische Protein, nAvd, wurde auf seine Funktion hin untersucht, da bis heute zwar bekannt war, dass es für das *Mutagenic Homing* notwendig ist (Doulatov et al., 2004), aber nicht seine genaue Funktion im Mechanismus.

#### 3.1 Untersuchung der reversen Transkriptase

In den folgend dargestellten Experimenten wurden vor allem die Löslichkeit, Stabilität und Aktivität der RT analysiert, da diese sich in dieser Arbeitsgruppe aber auch in anderen Studien (Alayyoubi et al., 2013; Roth et al., 1985), als kritische Faktoren bei der Arbeit mit RTs herausstellten. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der RT des DGR-Systems aus *Nostoc sp.* PCC 7120. Zudem wurden in allen Versuchen als Kontrollen die M-MLV RT sowie die endogenen Proteine aus *E. coli* mit untersucht und analysiert.

##### 3.1.1 Ortsspezifische Mutagenese der RTs aus *Nostoc sp.* PCC 7120 und *Bordetella*-Phage zur Erhöhung der Stabilität

In einer jüngst veröffentlichten Studie konnte durch eine Mutation die Stabilität der RT aus dem *Bordetella*-Phagen DGR, kurz bRT, erhöht werden. Hierzu wurde an Position 138 das Aspartat (D) durch ein Glutamin (Q) ersetzt, weshalb die Mutante D138Q benannt wurde (Alayyoubi et al., 2013). Eine solche Mutante wurde in der vorliegend Arbeit ebenfalls angefertigt. Darüber hinaus wurde eine analoge Mutante der nRT erzeugt, um deren Stabilität zu erhöhen. Dazu wurde ein Alignment von bRT und nRT erstellt, um die entsprechende Position in der RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 ausfindig zu machen (Schillinger, 2013). Anschließend wurde an dieser Position (135) der nRT der Aspartatrest gegen ein Glutamin ausgetauscht (Sequenzvergleich: II.I, Anhang). Diese Mutationen wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit nachfolgender PCR eingebracht (2.2.2.9) und die PCR-Produkte anschließend durch Sequenzierungen kontrolliert.

Durch diese Mutation konnte für die bRT zwar eine erhöhte Stabilität erreicht werden, jedoch nahm die Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-bRT ab (Alayyoubi et al., 2013). Da die Stabilität eines Proteins

für weiterführende Analysen notwendig ist, wurde neben der Wildtyp-nRT (pTS23: nRT mit C-terminalem His-Tag; pTS26: nRT ohne Tag) vor allem die hier hergestellte Mutante nRT D135 (pKH3: nRT D135 mit N-terminalem His-Tag) in den folgenden Versuchen verwendet.

### **3.1.2 Die rekombinante Überexpression und Aufreinigung der RTs erwiesen sich als problematisch**

Generell erweisen sich Arbeiten mit reversen Transkriptasen als problematisch, was der Grund für die wenigen entschlüsselten Kristallstrukturen und Aktivitätsanalysen von RTs ist. Bis zu dem heutigen Datum konnte lediglich von drei RTs die Kristallstruktur entschlüsselt werden (Das und Georgiadis, 2004; Gillis et al., 2008; Jacobo-Molina et al., 1993; L. Kohlstaedt et al., 1992), denn dafür wird eine hohe Expressionsrate, Löslichkeit, Konzentration und Reinheit des Proteins benötigt. Dies sind genau die Punkte, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurden, denn die Expressionsrate war in vorherigen Arbeiten oft schwach (Morgenstern, 2014; Schillinger, 2013, unveröffentlichte Arbeiten von Dipl. Biol. Maike Gieseke und M.Sc. Lisa Jakobi, Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern). Falls jedoch eine höhere Expressionsrate erzielt werden konnte, lag der Hauptanteil der Proteine unlöslich als Einschlusskörperchen vor. Daher wurden anfangs Expressionsversuche in großen Maßstäben mit diversen Konstrukten und verschiedensten Bedingungen analysiert. Die wichtigsten Parameter sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

#### ***3.1.2.1 Optimierung der Überexpression und der Zellyse***

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden die Auswirkungen verschiedener Parameter während der Expression und der Zellyse untersucht. Hierbei wurde die IPTG-Konzentration zur Induktion der Expression schrittweise reduziert. Zu Beginn der Analysen wurde die Genexpression mit einer IPTG Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  induziert, welche durch Optimierung auf 100  $\mu\text{M}$  reduziert wurde. Des Weiteren wurde die Expressionstemperatur von 37 °C auf 16 °C reduziert. Somit kann durch die optimierte IPTG-Konzentration und Expressionstemperatur eine langsamere und schonendere Expression erreicht werden. Dies trägt zu einer verbesserten Faltung der Proteine bei und die Bildung von Einschlusskörperchen wird verringert (Sørensen und Mortensen, 2005; Villaverde und Carrió, 2003). Um trotzdem genügend Protein zu erhalten, wurde die Expressionszeit schrittweise von 3 Stunden auf letztendlich über Nacht verlängert. Somit wurden die Expressionsbedingungen für die weiterführenden Versuche wie folgt festgelegt: Induktion mit 100  $\mu\text{M}$  IPTG, Expression bei 16 °C und 200 rpm über Nacht.

Ein weiterer Punkt, der einen hohen Einfluss auf die Expression und Löslichkeit der Proteine hat, ist die Wahl der kompetenten Zellen. Dazu wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Konstrukte in T7 Express, Rosetta 2 und BL21 Zellen exprimiert. Einzig die RT des *Bordetella*-Phagen wurde stets in BL21 Zellen exprimiert. Die Eigenschaften der kompetenten Zellen sind in Tabelle 3 dargestellt. Am Beispiel der *Nostoc sp.* PCC 7120 RT mit N-terminalem 6x His-Tag konnte eine deutliche Überexpression der nRT in allen drei kompetenten Zellen beobachtet werden (Abbildung 34, Anhang), wobei der Anteil an löslichem Protein in den BL21 kompetenten Zellen am höchsten war. Die anderen getesteten RTs aus dem *Vibrio* Phage VHML und *Thermus aquaticus* zeigten eine deutlich schwächere Expression in T7 express und Rosetta 2 Zellen bzw. einen größeren Anteil an Einschlusskörperchen (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurden für die weiteren Versuche BL21 Zellen verwendet. Auch die Lagerdauer der transformierten Zellen kann nachfolgende Analysen beeinflussen, da die Fitness der Zellen durch Lagerung abnehmen kann. Um dies zu vermeiden wurden vor jeder Überexpression die Plasmide frisch transformiert.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Expression und Löslichkeit der RTs aus verschiedenen Organismen. Hierbei ist zu entnehmen, dass die Genexpression der RT aus dem *Vibrio* Phage VHML und dem *Bordetella*-Phagen in BL21 Zellen sehr schwach und für weitere Experimente nicht ausreichend war. Im Gegensatz dazu konnten die RTs aus *Nostoc sp.* PCC 7120 (nRT) und *Thermus aquaticus* (*Taq* RT), unabhängig des 6x His-Tags, überexprimiert werden, sodass sie als stärkste Proteine, oder zumindest eines der stärksten, vertreten waren. Somit wurden die weiterführenden Versuche vor allem mit der *Taq* RT und nRT fortgeführt. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der nRT, da diese schon als Teil eines DGR-Systems nachgewiesen wurde (Doulatov et al., 2004; Schillinger et al., 2012). Des Weiteren wurde aus diesem DGR-System ebenfalls die akzessorische variable Determinante (nAvd) überexprimiert, was die Analyse einer potentiellen Interaktion zwischen der nRT und nAvd ermöglicht (3.2 und 3.1.4).

**Tabelle 14: Überblick zu Expression und Löslichkeit der RTs aus verschiedenen Organismen unter gleichen Expressionsbedingungen**

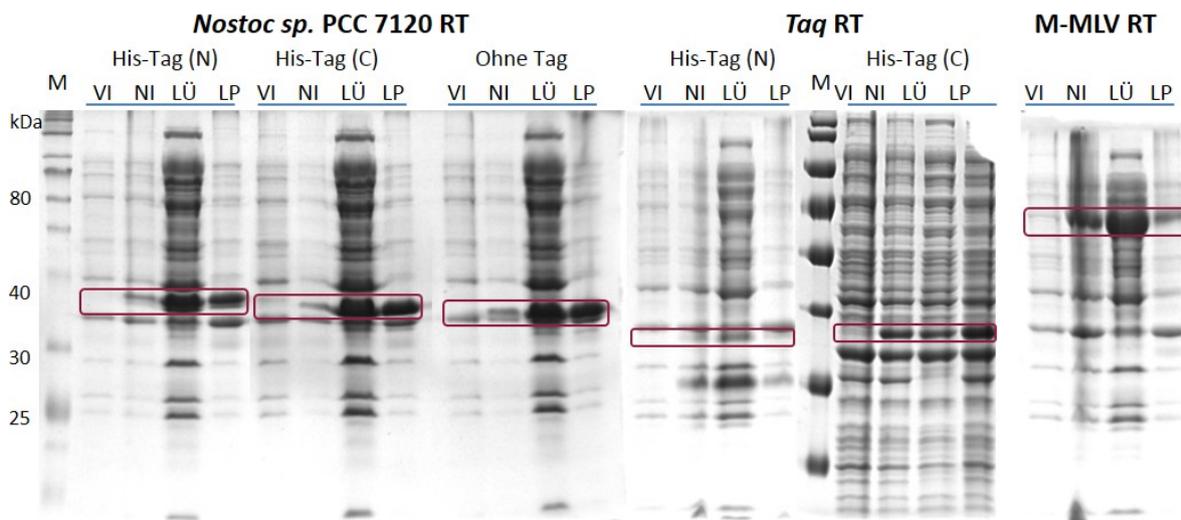
Organismus der RT	6x His-Tag	Expression in BL21 kompetenten Zellen	Löslichkeit
<i>Bordetella</i> -Phage	N-terminal	Sehr schwach	Nicht löslich (WT und D138Q)
<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120	N-terminal	Ausreichend	Löslich: ca. 50 % (WT und D135Q)
	C-terminal	Ausreichend	Löslich: ca. 50 %
	-	Ausreichend	Löslich: ca. 50 %
<i>Thermus aquaticus</i> Y51MC23	N-terminal	Ausreichend	Löslich: ca. 50 %
	C-terminal	Ausreichend	Löslich: ca. 50 %
<i>Vibrio</i> Phage VHML	N-terminal	Sehr schwach	Nicht löslich
	C-terminal	Sehr schwach	Nicht löslich

Ein weiterer Faktor, der die Löslichkeit eines Proteins beeinflussen kann, ist die Lysemethode. Im Verlauf dieser Arbeit wurden daher diverse Methoden ausgetestet, um die Löslichkeit der RTs zu erhöhen. Dazu wurden schonende Lysemethoden wie mehrmaliges Einfrieren und Auftauen (Johnson und Hecht, 1994; Moré et al., 1994), oder die Zellyse mittels Glasperlen ausgetestet. Jedoch konnte mit diesen Methoden keine vollständige Zellyse erreicht werden. Zudem ist der zeitliche Aufwand deutlich höher als bei der Zellyse mittels Ultraschallbehandlung. Da der Anteil von löslichem Protein bei allen drei Methoden, Einfrieren und Auftauen, Glasperlen und Ultraschall, ähnlich war, wurde die Zellyse mittels Ultraschallbehandlung in den weiteren Versuchen verwendet.

### **3.1.2.2 Überexpression der RTs aus *Nostoc sp.* PCC 7120 und *Thermus aquaticus***

Nach dem Ermitteln der Expressionsparameter wurden die Überexpressionen für die folgenden Aktivitätsstudien regelmäßig ausgeführt. Beispielhafte Überexpressionen der nRT und *Taq* RT mit den Proben vor der Induktion (VI), nach der Induktion und Expression (NI) und des Überstandes sowie Pellets nach Zellyse (LÜ und LP) sind in Abbildung 5 gezeigt. Zudem ist die Überexpression der M-MLV RT, welche in den anschließenden Aktivitätsassays als Positivkontrolle genutzt wurde, dargestellt. Die jeweiligen Banden, die den RTs zugeordnet werden können, sind mit einem dunkelroten Rechteck markiert. Die blauen Linien verdeutlichen, welche Proben von einem Konstrukt stammen. Bei dem

Vergleich der VI und NI Proben der verschiedenen Expressionen ist eine deutliche Bande in der NI Probe zu erkennen, welche nicht in den VI Proben vertreten ist. Vergleicht man nun den Anteil der löslichen Proteine (LÜ) mit dem der Einschlusskörperchen (LP) liegt ca. die Hälfte der Proteine in einem löslichen Zustand vor. Die M-MLV RT liegt hingegen zum Großteil löslich vor. Diese löslichen Proteine wurden entweder direkt für Aktivitätsstudien verwendet oder weiterführend aufgereinigt. Die Ergebnisse der diversen Aufreinigungsmethoden sind im folgenden Abschnitt beschrieben.



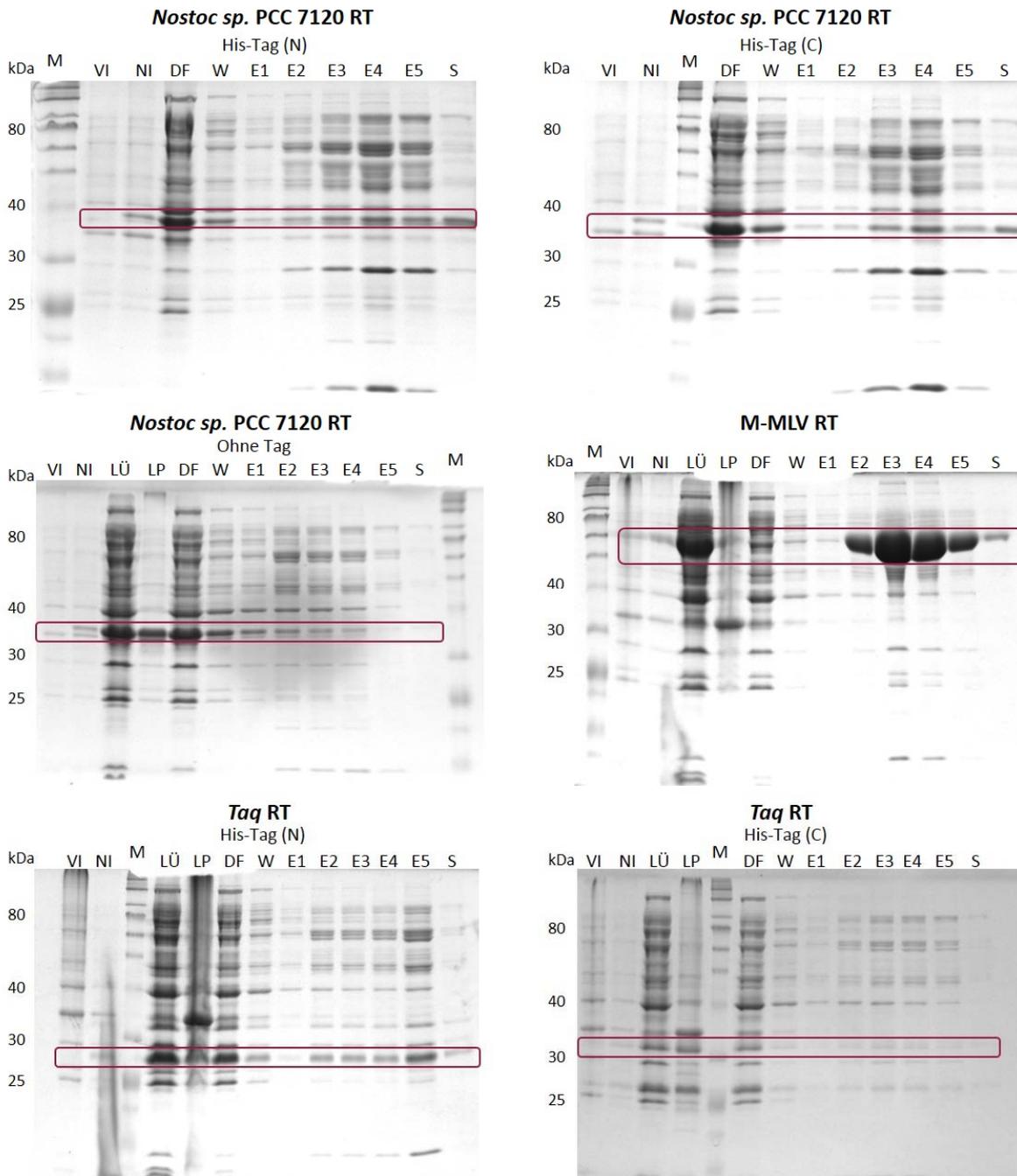
**Abbildung 5: Beispielhafte Überexpression der RTs aus *Nostoc sp. PCC 7120*, *Thermus aquaticus* (*Taq*) und M-MLV.** Die Überexpression wurde durch die Zugabe von 100  $\mu$ M IPTG induziert. Nach der Expression über Nacht bei 16 °C und 200 rpm folgten Zellernte, Zellyse und Zentrifugation. Die Teilproben vor der Induktion (VI), nach der Induktion (NI), des Überstandes und des Pellets nach der Zellyse (LÜ und LP) wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Die Expression erfolgte von verschiedenen Konstrukten: nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3) oder C-Terminus (pTS23) fusioniert, nRT ohne Tag (pTS26), *Taq* RT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pTS18) oder C-Terminus fusioniert (pTS21) sowie M-MLV RT (pSD008) mit 6x His-Tag. Als Laufkontrolle wurden Proteinmarker (M, ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range, NEB bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Abbildung ist aus verschiedenen SDS-Gelen zusammengesetzt. Die dunkelroten Rechtecke markieren die exprimierten reversen Transkriptasen. Die blauen Linien verdeutlichen, welche Proben von einem Konstrukt stammen.

### 3.1.2.3 Aufreinigung der RTs aus *Nostoc sp. PCC 7120* und *Thermus aquaticus*

Um die löslichen RTs in möglichst reiner Form zu erhalten, wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden ausgetestet. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

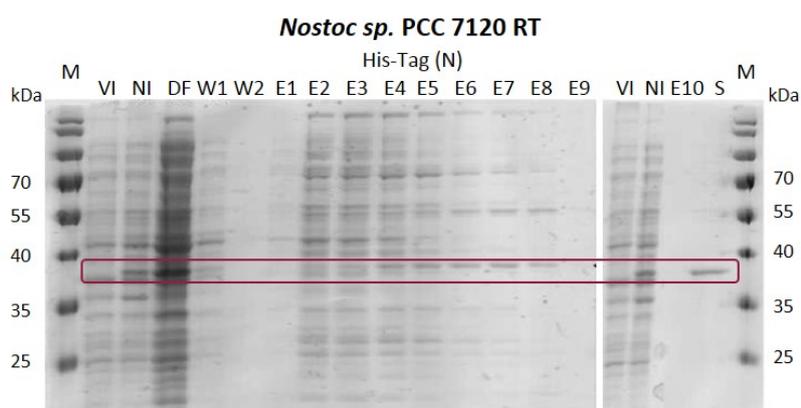
Die Aufreinigung über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) wurde als Standardmethode gewählt. Wie in Abbildung 6 gezeigt, war eine effiziente Bindung an Ni-NTA-Komplexe trotz einiger Optimierungsversuche nicht möglich. Beispielsweise konnte eine verbesserte Bindung der RTs an die Nickelsäulen durch die Zugabe von Imidazol in den Lysepuffer zur Reduzierung unspezifischer

Bindungen endogener Proteine an die Ni-NTA erreicht werden. Dadurch kann zwar die Ausbeute des Proteins beeinträchtigt, aber gleichzeitig dessen Reinheit erhöht werden (Hölscher et al., 2006). Jedoch verblieb der Hauptteil der nRT und *Taq* RT (markiert durch dunkelrote Rechtecke) in den Durchflussproben (DF), während in den Elutionsproben (E1-E5) nur schwache RT-Banden zu sehen sind. Dieses Ergebnis ist von der Position des 6x His-Tags unabhängig. Zum Vergleich wurde testweise die nRT ohne 6x His-Tag mit der Nickel-NTA inkubiert und anschließend eluiert. Hier ist der Hauptteil der nRT ebenfalls im Durchfluss zu erkennen, jedoch kann auch hier in den Elutionsproben eine Bande der nRT beobachtet werden. Somit findet die Bindung der nRT, vermutlich auch der *Taq* RT, an die Ni-NTA Kügelchen nicht über den 6x His-Tag, sondern über andere, positiv geladene, Regionen der RT statt. Darüber hinaus wäre auch ein Ausfallen der RTs auf der Nickelmatrix möglich. Dadurch würde ebenfalls keine Bindung zustande kommen. Im Gegensatz dazu ist die Aufreinigung der M-MLV RT in hoher Reinheit und Konzentration möglich (Abbildung 6).



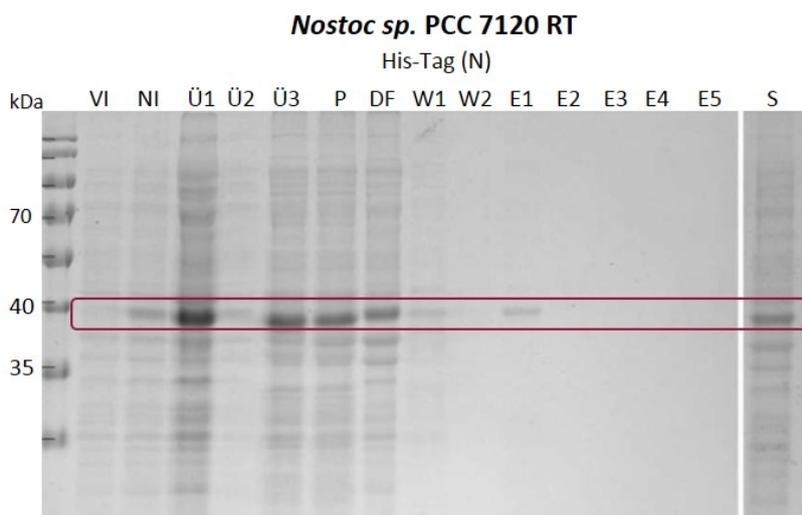
**Abbildung 6:** RTs aus *Nostoc sp. PCC 7120*, *Thermus aquaticus (Taq)*, welche an einen His-Tag fusioniert sind, binden nicht an Nickelmatrix. Nach der Inkubation der Überstände nach der Lyse mit den Ni-NTA-Komplexen bei 4 °C wurden die Proteine mit steigender Imidazolkonzentration von der Säule eluiert. Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), des Durchflusses (DF), des Waschschrittes (W), der Elutionsproben (E1-E5) und der Ni-Säule (S) wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brillinat-Blau angefärbt. Zu sehen sind die Aufreinigungen der nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3, Mutante D135) und C-Terminus (pTS23, Wildtyp) fusioniert, nRT ohne Tag (pTS26, Wildtyp), M-MLV RT (pSD008), *Taq* RT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pTS18) und C-Terminus fusioniert (pTS21). Als Laufkontrolle wurde Proteinmarker (M, ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range, NEB) verwendet. Die dunkelroten Rechtecke markieren die reversen Transkriptasen.

Alternativ wurde die Aufreinigung über Heparin-Affinitätschromatographie ausgetestet, da sich diese Aufreinigungsmethode bei reversen Transkriptasen, wie beispielweise der RT aus dem M-MLV (Kotewicz et al., 1988), als geeignet erwiesen hat. Hierbei wurden Ergebnisse beobachtet, die denen der Aufreinigung mittels Ni-NTA sehr ähnlich waren. Es wurde nur ein kleiner Anteil der nRT an die Heparin-Agarose gebunden und somit waren war der Hauptteil der nRT im Durchfluss zu finden (Abbildung 7). Da trotz diverser Optimierungsversuche keine effiziente Aufreinigung möglich war, wurde diese Aufreinigungsmethode nicht weiter verfolgt.



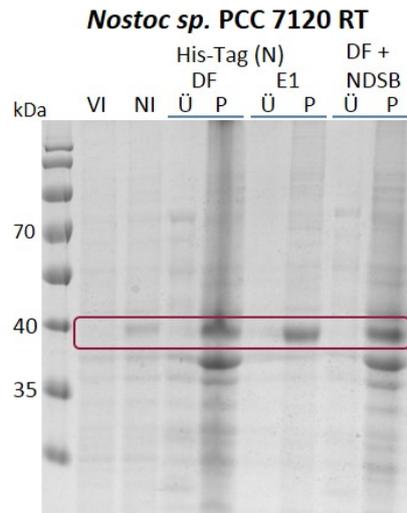
**Abbildung 7: Eine effiziente Aufreinigung der RT aus *Nostoc sp. PCC 7120*, welche an einen His-Tag fusioniert ist, war über Heparin-Agarose nicht möglich.** Nach der Inkubation der Überstände nach der Lyse mit der Heparin-Agarose bei 4 °C wurden die Proteine mit steigender NaCl-Konzentration von der Säule eluiert. Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), des Durchflusses (DF), der Waschschrte (W1, W2), der Elutionsproben (E1-E10) und des Säulenmaterials (S) wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brillinat-Blau angefärbt. Zu sehen ist die Aufreinigung der nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3, Mutante D135). Als Laufkontrolle wurde Proteinmarker (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die dunkelroten Rechtecke markieren die reversen Transkriptasen. (Angepasste Abbildung von Lisa Morgenstern)

Durch die zuvor beschriebenen Aufreinigungsversuche liegt die Vermutung nahe, dass der 6x His-Tag bei korrekt gefalteten und löslichen Proteinen im Zentrum oder zumindest unzugänglich liegt, sodass eine Bindung daran nicht möglich ist. Daher wurde eine denaturierende Aufreinigungsmethode mittels Urea getestet. Hierzu wurden entsprechend die Überexpression, Zellyse und Aufreinigung nach einem denaturierenden Protokoll durchgeführt (2.2.3.1 und 2.2.3.2), welche in Abbildung 8 zu sehen sind. Dabei ist zu erwähnen, dass erst ab der Zugabe des Lysepuffers DNPI-10 (Ü3) das Denaturierungsmittel Harnstoff verwendet wurde und somit die Proteine ab diesem Punkt denaturiert vorliegen. Zuvor wurden mit dem Lysepuffer NPI-10 ohne Denaturierungsmittel (Ü1 und Ü2, 2.1.2.2) die löslichen Proteine aufgenommen.



**Abbildung 8:** Die RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 konnte durch denaturierende Zellyse und Aufreinigung mittels Urea nicht aufgereinigt werden. Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), der verschiedenen Überstände (Ü1-3), des Pellets (P) und der Aufreinigungsproben Durchfluss (DF), Waschen (W1-2), Elution (E1-5) und der Säule (S) wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Gezeigt sind die Expression, Lyse und Aufreinigung der nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3, Mutante D135) unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff). Als Laufkontrolle wurde Proteinmarker (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die dunkelroten Rechtecke markieren die reverse Transkriptase. (Angepasste Abbildung von Lisa Morgenstern)

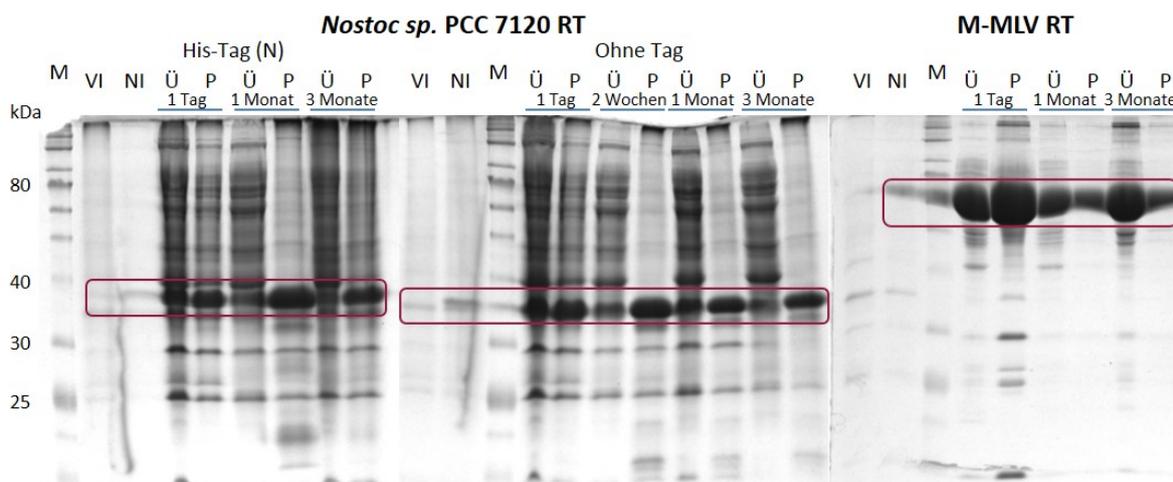
Auch hier ist ein Großteil der nRT ungebunden im Durchfluss (DF) vertreten, während ein gewisser Anteil gebunden an der Ni-Säule (S) zu beobachten ist. Ein Teil der nRT mit N-terminalen 6x His-Tag konnte an die Nickelsäulen gebunden und sauber eluiert werden (E1), jedoch war eine Rückfaltung der nRT mittels Dialyse in einen nativen Zustand nicht möglich. In Dialysepuffern ohne Denaturierungsmittel wie Harnstoff, lag die nRT nicht korrekt gefaltet vor und fiel bei anschließender Zentrifugation aus. Neben einer denaturierenden Aufreinigung über Harnstoff wurde auch Guanidin als Denaturierungsmittel getestet, jedoch war auch hierbei keine Rückfaltung der Proteine möglich (Daten nicht gezeigt). Auch eine Unterstützung der korrekten Rückfaltung durch das NDSB Rückfaltungsreagenz (Vuillard et al., 1995), konnte die Bildung von Einschlusskörperchen nicht verhindern. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 9 verdeutlicht. Die Versuche zur denaturierenden Aufreinigung und Rückfaltung wurden teilweise von Lisa Morgenstern, M.Sc., im Rahme ihrer Masterarbeit durchgeführt (Morgenstern, 2014).



**Abbildung 9: Eine Rückfaltung der nRT nach denaturierender Aufreinigung ist nicht möglich.** Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), sowie Überstände (Ü) und Pellets (P) nach der Dialyse wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Zu sehen sind der dialysierte Durchfluss (DF) mit und ohne Zugabe von NDSB und die Elutionsprobe (E1) nach der denaturierenden Aufreinigung. Als Laufkontrolle wurde ein Proteinmarker genutzt (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Das dunkelrote Rechteck markiert die reverse Transkriptase. (Angepasste Abbildung von Lisa Morgenstern)

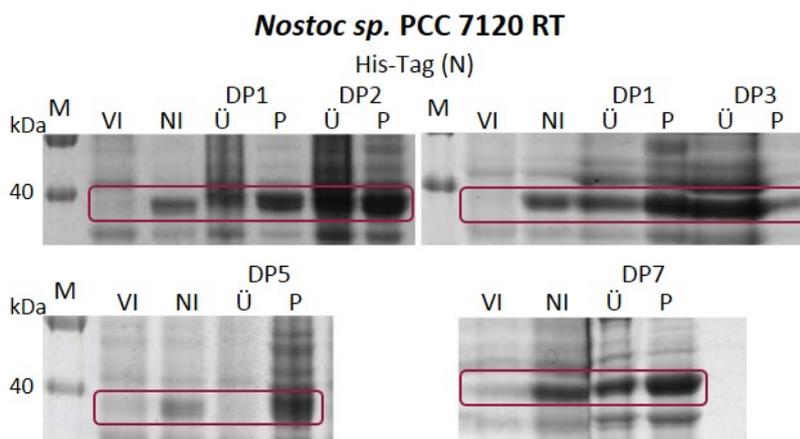
### 3.1.3 Die RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 ist *in vitro* unlöslich und fällt bei Lagerung aus

Neben den Schwierigkeiten bei der Expression und Aufreinigung stellte die niedrige Stabilität der zu testenden nRT mit sowie ohne His-Tag für die anschließenden Aktivitätsanalysen ein großes Problem dar. Daher wurde untersucht, ob die Stabilität durch unterschiedliche Lagerung erhöht werden kann. Dazu wurde das Rohextrakt nach Überexpression in Dialysepuffer 1 (DP1) dialysiert und die Lagerfähigkeit beobachtet. Diesbezüglich wurden Lagerungen bei verschiedenen Temperaturen von -80 °C bis 4 °C verglichen. Hierbei konnte keine verbesserte Stabilität bei einer bestimmten Temperatur beobachtet werden. Zudem spielte die Lagerdauer eine wichtige Rolle für die Stabilität. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich nimmt der Anteil an löslicher nRT mit steigender Lagerdauer stetig ab, sodass nach einer Lagerung von 2-4 Wochen ein Hauptteil unlöslich in den Pelletproben (P) zu finden ist, was nach 3-monatiger Lagerdauer noch etwas ausgeprägter zu beobachten ist. Dieses Ergebnis ist von dem 6x His-Tag unabhängig. Im Gegensatz dazu liegt die M-MLV RT auch nach 3-monatiger Lagerung noch zum Großteil löslich im Überstand (Ü) vor.



**Abbildung 10: Die Stabilität der RT aus *Nostoc sp. PCC 7120* nimmt mit zunehmender Lagerdauer ab.** Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), sowie Überstand- und Pelletproben (Ü und P) nach Zentrifugation der RT nach einer Lagerdauer von einem Tag bis 3 Monaten bei -80 °C wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Zu sehen sind die Proben der nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3), nRT ohne Tag (pTS26, Wildtyp RT) sowie M-MLV RT (pSD008). Als Laufkontrolle wurde Proteinmarker (M, ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range, NEB) verwendet. Die dunkelroten Rechtecke markieren die exprimierten reversen Transkriptasen. Die blauen Linien verdeutlichen die zusammengehörigen Ü und P Proben der gleichen Lagerdauer

Auch das Verwenden von verschiedenen Lagerpuffern konnte die Stabilität der nRT nicht ausreichend erhöhen. Selbst wenn die nRT kurzzeitig löslich und stabil vorlag, nahmen die Löslichkeit und Stabilität innerhalb von einer Woche drastisch ab. Zudem war teilweise eine Abnahme der nRT-Aktivität in den anschließenden Aktivitätsassays zu beobachten. In Abbildung 11 ist ein Ausschnitt der Stabilität der nRT in verschiedenen Lagerpuffern dargestellt. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Lagerpuffer sind in Tabelle 18 (Anhang) zu finden. Diese Versuche wurden teilweise von Lisa Morgenstern, M.Sc. im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Morgenstern, 2014).



**Abbildung 11: Vergleich der Stabilität der nRT (pKH3) in verschiedenen Dialysepuffern.** Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), sowie Überstand- und Pelletproben (Ü und P) nach Zentrifugation der dialysierten RT nach unterschiedlicher Lagerdauer wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Als Laufkontrolle wurde ein Proteinmarker verwendet (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Die dunkelroten Rechtecke markieren die reverse Transkriptase. (Angepasste Abbildung von Lisa Morgenstern)

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, liegt ein Großteil der nRT in allen getesteten Dialysepuffern in den Pelletproben (P) als Einschlusskörperchen vor, während in den Proben des Überstandes (Ü) ein kleinerer Anteil an löslicher nRT aufzufinden ist. Die nRT scheint zwar im Dialysepuffer 3 (DP3) weniger ausgefallen zu sein, jedoch ist hier generell weniger Proteinprobe geladen worden. Beim Vorbereiten der Pelletproben wurde jeweils eine Pipettenspitze des Pellets im SDS-Ladepuffer gelöst. Hierbei konnte es zu Schwankungen in der Proteinkonzentration kommen.

RTs weisen generell eine niedrige Stabilität auf, da sie bereits nach kurzer Lagerung ihre Aktivität verlieren können (Alayyoubi et al., 2013). Dies traf auch auf die Stabilität der *Taq* RT sowie der nRT zu, sodass sie für weitere Aktivitätsanalysen nur für eine sehr kurze Zeitspanne verwendet werden konnten. Dadurch war es notwendig für jede Versuchsreihe eine neue Charge von RT-Protein herzustellen, was spätere Analysen und Auswertungen nicht reproduzierbar machte.

### 3.1.4 Aktivitätsanalysen der RT aus *Nostoc sp. PCC 7120*

Zur Untersuchung der nRT-Aktivität wurden zwei verschiedene Methoden gewählt. Zum einen wurden RT-Assays mit radioaktiver Markierung durchgeführt (nach Das und Georgiadis, 2001; Matsuura et al., 1997), welche im Anschluss mittels DNase-Verdau weiter analysiert werden konnten. Zum anderen wurden im Anschluss an nicht radioaktiv markierte RT-Assays RT-PCRs durchgeführt, deren Produkte dann sequenziert wurden. Für diese Versuche wurde eine kontextfremde RNA/Primer-Matrize

(pNZ004/TS49 aus dem eukaryotischen Retrotransposon UnaL2) und eine RNA/Primer-Matrize aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR-System (pKH2/PM151), welche vermutlich die TR-Sequenz darstellt, untersucht (II.IV, Anhang).

### 3.1.4.1 Erste Hinweise auf eine nRT-Aktivität

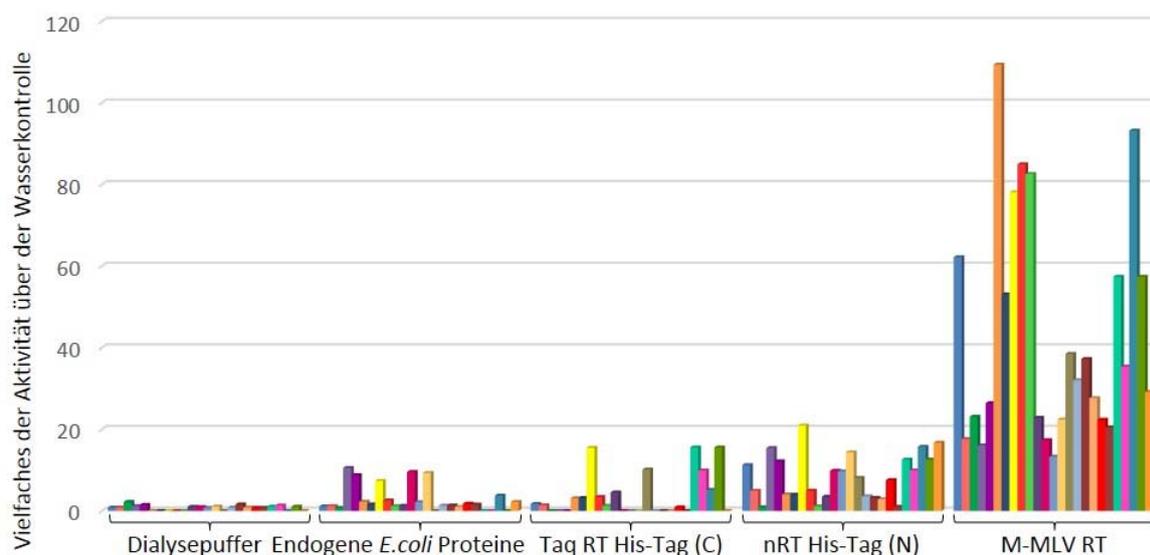
Um erste Hinweise auf eine mögliche Aktivität der nRT und *Taq* RT zu erhalten wurden RT-Assays durchgeführt, bei welchen radioaktiv markierte Nukleotide ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) während der reversen Transkription von den RTs inkorporiert wurden, sodass eine radioaktiv markierte cDNA entsteht. Das radioaktive Signal wurde im Anschluss mit einem Szintillationszähler detektiert, wodurch eine schnelle Analyse möglich war. Zur Veranschaulichung ist in Tabelle 15 exemplarisch das Ergebnis eines radioaktiv markierten RT-Assays dargestellt. Dabei sind die durch die Szintillationsmessung absoluten Counts, sowie die vielfachen Werte über der Wasserkontrolle gezeigt. Dieser beispielhafte RT-Assay zeigt deutlich die hohe Aktivität der M-MLV RT und eine erhöhte Aktivität der nRT, während die *Taq* RT, die endogenen *E. coli* Proteine und der Dialysepuffer keine deutlich erhöhten Werte aufweisen. Die hier dargestellten Versuche wurden mit dem Rohextrakt der Proteine, welche in Dialysepuffer dialysiert wurden, durchgeführt, da keine effiziente Aufreinigung möglich war (3.1.2.3).

**Tabelle 15: Absolute Counts sowie Vielfaches der Werte über der Wasserkontrolle eines beispielhaften radioaktiv markierten RT-Assays.** Dargestellt sind die Werte der Wasserkontrolle, des Dialysepuffers, der endogenen *E. coli* Proteine, der *Taq* RT, nRT und M-MLV-RT.

Probe	Absolute Counts [CPMC]	Relative Werte über der Wasserkontrolle
Wasserkontrolle	119	1
Dialysepuffer	98	0,82352941
Endogene <i>E. coli</i> Proteine	136	1,14285714
<i>Taq</i> RT (pTS21)	206	1,73109244
nRT (pKH3)	1337	11,2352941
M-MLV RT	7403	62,210084

Bei der Auswertung der verschiedenen RT-Assays wurde von einer Errechnung der Mittelwerte sowie der Standardabweichungen abgesehen, da diese durch die niedrige Reproduzierbarkeit der Versuche

keine geeigneten Verfahren zur Auswertung darstellen. Um einen Überblick über die Ergebnisse zu erhalten, wurden die radioaktiv markierten RT-Assays in einem Diagramm zusammengefasst, welches in Abbildung 12 dargestellt ist. Gezeigt ist das Vielfache des radioaktiven Signals der Proben über der Wasserkontrolle.



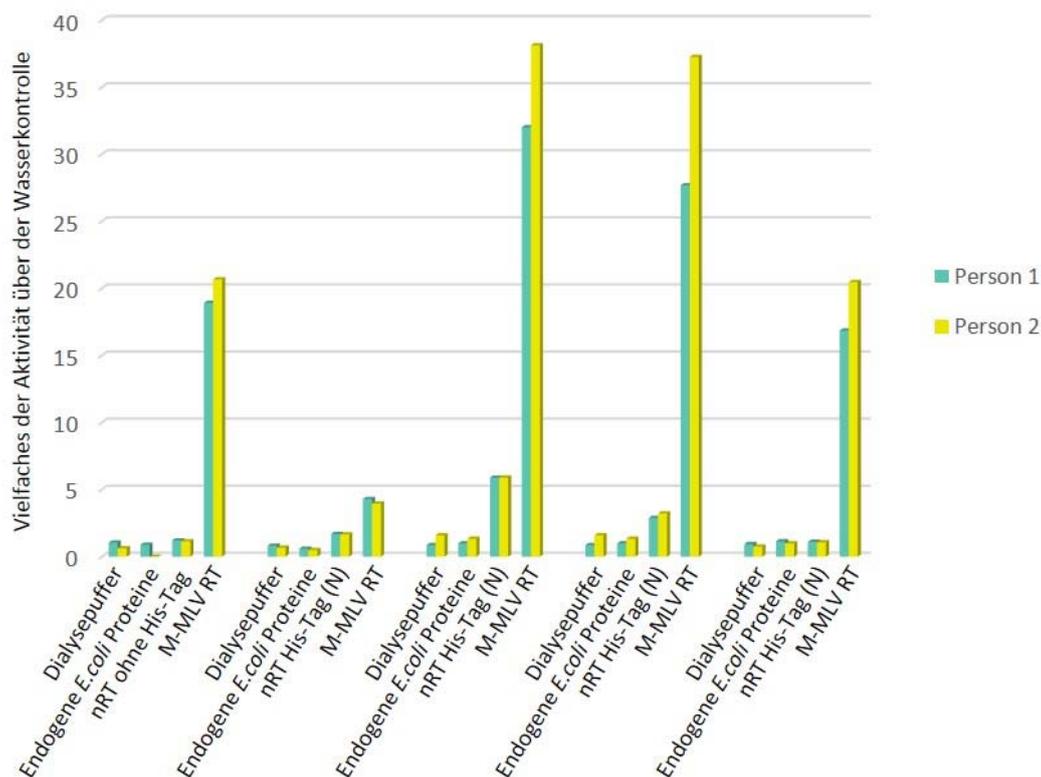
**Abbildung 12: Zusammenfassung der 25 analysierten radioaktiv markierten RT-Assays.** Getestet wurden die *Taq* RT mit C-terminalem 6x His-Tag (pTS21) und nRT mit N-terminalem 6x His-Tag (pKH3). Zudem wurden als Negativkontrollen eine Wasserkontrolle, der Dialysepuffer, in welchen die Proteine gelagert wurden, sowie die endogenen *E. coli* Proteine (pUC19) und als Positivkontrolle die M-MLV RT (pSD008) analysiert. Hierzu wurden das radioaktive Signal ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) der einzelnen Proben mittels Szintillationszähler ermittelt und die erhaltenen Werte durch den Wert der Wasserkontrolle dividiert, um ein Vielfaches des radioaktiven Signals über der Wasserkontrolle (=1) zu erhalten. Die verschiedenen Farben der Balken stellen jeweils einzelne Versuchsreihen dar, die teilweise mit verschiedenen Proteinpräparationen durchgeführt wurden.

Die Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen, welche jeweils farblich markiert sind, sind deutlich zu erkennen. Ebenso kann dem Diagramm entnommen werden, dass die M-MLV RT in allen Versuchsreihen die höchste Aktivität aufwies, wenn auch hierbei große Schwankungen von 13-fach bis 109-fach über der Wasserkontrolle zu beobachten sind. Die nRT und die *Taq* RT zeigen Werte von bis zu 21-fach bzw. 16-fach über der Wasserkontrolle. Jedoch weisen beide getesteten RTs, vor allem aber die *Taq* RT, auch sehr niedrige Werte auf, wobei keine Aktivität gemessen werden konnte. Hinzu kommt, dass einige RT-Präparationen von Anfang an keine Aktivität aufwiesen oder die Aktivität innerhalb von 1-2 Tagen gravierend abnahm, sodass sie nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zudem korrelieren besonders hohe Werte der nRT und *Taq* RT teilweise mit erhöhten Werten der endogenen *E. coli* Proteinproben (bspw. Versuchsreihe 8, gelbe Balken). Ausnahmen davon stellen beispielsweise die Versuchsreihen 1 (blau, vgl. Rohdaten Tabelle 15) oder 25 (orange) dar, bei welchen

die nRT-Aktivität ca. 11-fach bzw. 17-fach über der Wasserkontrolle liegen, während die Proben der endogenen *E. coli* Proteine ca. 1-fach bzw. 2-fach über der Wasserkontrolle liegen. In keinem der hier durchgeführten Versuche lag die gemessene Aktivität der endogenen *E. coli* Proteinproben deutlich über der der RT-Proben. Trotzdem muss von einer gewissen Grundaktivität durch die endogenen *E. coli* Proteine ausgegangen werden, welche die Versuche beeinflussen kann. Während bei der Analyse der nRT-Mutante D135 (pKH3) Aktivität gemessen werden konnte, konnte keine Aktivität der Wildtyp-nRT nachgewiesen werden. Zur Analyse der Wildtyp-nRT-Aktivität wurde das Rohextrakt der Wildtyp-nRT mit C-terminalem His-Tag (pTS23) sowie ohne His-Tag (pTS26) getestet. Hierbei wurden Werte gemessen, die ca. 1-fach bis 2-fach über der Wasserkontrolle lagen, sodass von weiteren Analysen abgesehen wurde. Die folgenden Versuche und Interpretationen beziehen sich somit auf die nRT-Mutante D135 (pKH3).

Beide getesteten Matrizen, die postulierte TR-Sequenz aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR (pKH2/PM151) und die Matrize aus dem eukaryotischen Retrotransposon UnaL2 (pNZ004/TS49) (Tabelle 13 und II.IV), wiesen vergleichbare Ergebnisse auf, welche somit Matrizen-unabhängig sind. Weiterführend wurde untersucht, ob die Anwesenheit der nAvd einen Einfluss auf die Aktivität der nRT hat und diese beiden Komponenten möglicherweise einen Proteinkomplex bilden. Hierzu wurde die nAvd in verschiedenen Konzentrationen in die RT-Assays hinzugefügt. Hierbei konnte keine Steigerung der nRT-Aktivität durch die Zugabe von nAvd nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte teilweise sogar eine geringfügige Abnahme der RT beobachtet werden. Um ein mögliches Zusammenspiel analysieren zu können sind jedoch weiterführende Versuchsreihen erforderlich.

Durch die niedrige Stabilität der zu analysierenden RTs und die ständige neue Herstellung der RTs wurde die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuche erschwert, sodass es zu großen Abweichungen der Ergebnisse kommen konnte. Daher wurden, zur Kontrolle, dass die niedrige Reproduzierbarkeit nicht auf Ungenauigkeiten bei der Handhabung zurückzuführen war, Versuche parallel von zwei Personen durchgeführt. Die Auswertung dieser Versuche ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Vergleich 5 verschiedener RT-Assays, welche parallel von zwei Personen durchgeführt wurden.** Getestet wurde die nRT ohne 6x His-Tag (pTS26) bzw. mit N-terminalem 6x His-Tag (pKH3). Zudem wurden als Negativkontrolle eine Wasserkontrolle, der Dialysepuffer, in welchem die Proteine gelagert wurden, sowie die endogenen *E. coli* Proteine (pUC19) und als Positivkontrolle die M-MLV RT (pSD008) analysiert. Hierzu wurden das radioaktive Signal ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) der einzelnen Proben mittels Szintillationszähler ermittelt und die erhaltenen Werte durch den Wert der Wasserkontrolle dividiert, um ein Vielfaches des radioaktiven Signals über der Wasserkontrolle (=1) zu erhalten. Für die RT-Assays wurden die jeweils gleichen Materialien, Substanzen und Proteine von beiden Personen parallel benutzt. Die grünen Balken zeigen die Ergebnisse von Person 1 und die gelben Balken die Ergebnisse von Person 2. Die Versuche wurden an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichen Proteinpräparationen und Materialien durchgeführt.

Hierbei ist zu erkennen, dass die verschiedenen Versuchsreihen Unterschiede aufweisen. Dabei schwanken vor allem die Aktivität der M-MLV RT zwischen dem 4-fachen bis 38-fachen und die Aktivität der nRT zwischen dem 1,1-fachen bis 5,8-fachen über der Wasserkontrolle. Diese 5 Versuche wurden an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichen Proteinpräparationen und Materialien, wie beispielsweise frisch angesetzte dNTPs oder Matrizen durchgeführt, was Auswirkungen auf die Ergebnisse dieser Versuche hatte. Die jeweiligen Versuche der beiden Personen hingegen weisen ähnliche Ergebnisse auf. Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau gezeigt werden, dass Schwankungen der Aktivität nicht auf individuelle Pipettier- oder Anwendungsfehler bei der Durchführung, sondern auf andere Parameter zurückzuführen sind.

Darüber hinaus wurden Versuche in Duplices durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen, um Anwendungsfehler weiter auszuschließen. Zwar gab es auch hier voneinander abweichende

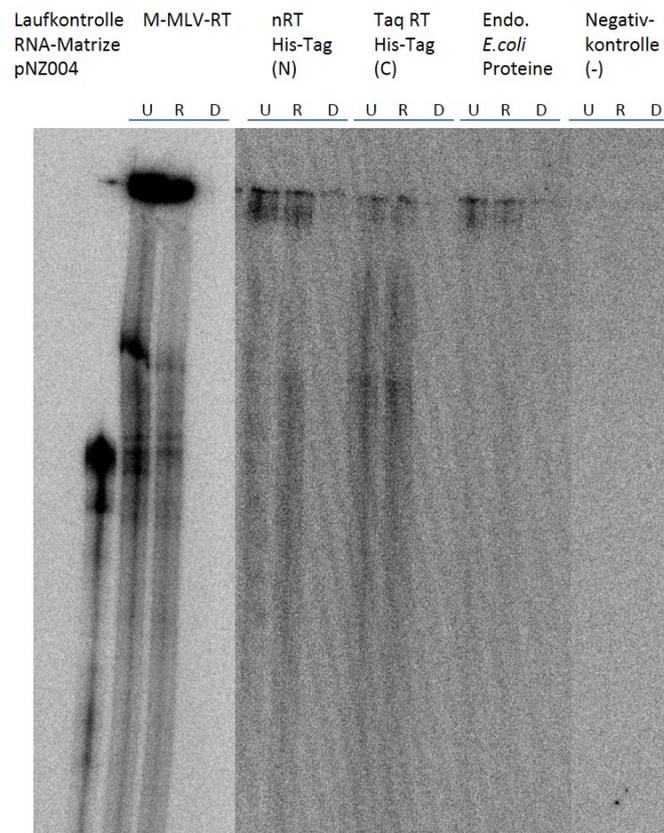
Ergebnisse, jedoch wurden durchaus Duplices mit vergleichbaren Ergebnissen gemessen. Ein exemplarischer Versuch ist in Tabelle 16 dargestellt. Hierbei ist ein Vielfaches der Werte über der Wasserkontrolle der verschiedenen Proben gezeigt. Die Werte des Dialysepuffers und der M-MLV-RT weisen mit ca. 1,6-fach und 0,8-fach bzw. 38-fach und 36-fach über der Wasserkontrolle die meisten Abweichungen auf. Die Proben der endogenen *E. coli* Proteine sowie der nRT zeigen mit Werten von zweimal 1,3-fach bzw. 5,9-fach und 5,4-fach über der Wasserkontrolle vergleichbare Ergebnisse. Somit konnte auch hier die niedrige Reproduzierbarkeit nicht auf Fehler in der Anwendung, sondern auf andere Parameter, vor allem die unterschiedlichen Proteinpräparationen, zurückgeführt werden.

**Tabelle 16: Vergleich einer Versuchsreihe der nRT-Aktivität in zweifacher Ausführung.** Dargestellt sind ein Vielfaches der Werte über der Wasserkontrolle des Dialysepuffers, der endogenen *E. coli* Proteine, nRT und M-MLV-RT.

Probe	1	2
Dialysepuffer	1,596363636	0,826666667
Endogene <i>E. coli</i> Proteine	1,334545455	1,313333333
nRT (pKH3)	5,901818182	5,393333333
M-MLV RT	38,12363636	35,97

### **3.1.4.2 Verdau der radioaktiv markierten RT-Assayprodukte zur Analyse der Nukleinsäuren**

Zur Analyse der während der RT-Assays synthetisierten Nukleinsäuren, wurden diese weiterführend verdaut. Dazu wurde im Anschluss an einen radioaktiv markierten RT-Assay ein Verdau der Nukleinsäuren mit DNase (D) bzw. RNase (R) durchgeführt. Außerdem blieb eine Teilprobe für spätere Vergleichszwecke unbehandelt (U). Nach dem Verdau wurden die verschiedenen Proben durch native PAGE aufgetrennt und mit dem Cyclone-System visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.



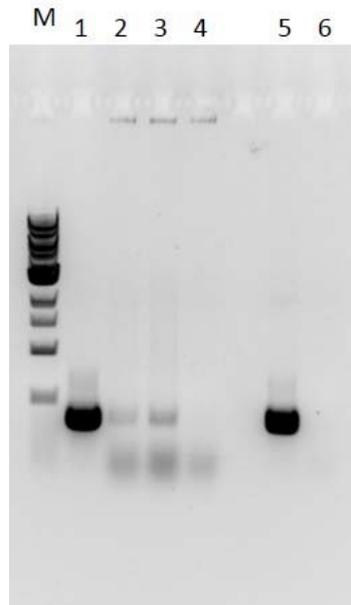
**Abbildung 14: Analytischer Verdau der während der RT-Assays generierten Nukleinsäuren.** Die Produkte der RT-Assays von M-MLV RT, nRT, *Taq* RT, der endogenen *E. coli* Proteine und der Negativkontrolle ( $H_2O$ ) wurden im Anschluss an die Assays mit RNase (R) oder DNase (D) bei 37 °C für 20 Minuten verdaut bzw. unverdaut analysiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte über 8 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\alpha-^{32}P]$ -ATP) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Als Laufkontrolle wurde die entsprechende RNA-Matrize (pNZ004) verwendet. In den unverdauten und mit RNase verdauten Proben (U und R) sind Banden erkennbar, während die mit DNase verdauten Proben (D) keine Banden aufweisen. Die Negativkontrolle weist keinerlei Banden auf.

Als Laufkontrolle wurde die entsprechende radioaktiv markierte RNA-Matrize aus dem eukaryotischen Retrotransposon UnaL2 (pNZ004) verwendet. Die Produkte der RT-Assays von M-MLV RT, nRT, *Taq* RT und der endogenen *E. coli* Proteine zeigen unterschiedlich starke Banden in den unbehandelten (U) und mit RNase verdauten (R) Proben. Die DNase-behandelten Proben zeigen in allen Fällen deutlich reduzierte bzw. keine Banden. Auffällig ist, dass die RNA-Laufkontrolle kleiner als die synthetisierten Nukleinsäuren auf dem Gel zu erkennen ist. Der Großteil der unbehandelten und mit RNase verdauten Proben ist in den Taschen zu sehen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass sich die Nukleinsäuren in einem Proteinkomplex mit den RTs oder anderen DNA-bindenden Proteinen befinden, wodurch die Auftrennung durch das feinporige Gel erschwert wird. Ein weiterer Teil der DNA ist zwischen der Tasche und der Kontrolle zu erkennen. Diese Banden könnten durch Templatsprünge generiert worden sein, ähnlich wie für die RT des R2-Retrotransposons beschrieben (Bibillo und Eickbush, 2004). Dabei springt die RT vom 5' Ende einer RNA-Matrize zum 3' Ende einer zweiten RNA-Matrize, wodurch längere Transkripte entstehen. Dies ist möglich, da die RT des R2-Retrotransposons am 5' Ende der ersten

Matrize Nukleotide, die nicht mit dem Templat assoziiert sind, hinzuzufügen und diese Überhänge mit dem 3' Ende der zweiten Matrize hybridisieren kann (Bibillo und Eickbush, 2004). Die Proben der M-MLV RT zeigen deutliche Banden, die mit dem Laufverhalten der Kontrolle vergleichbar sind. Die Proben der nRT sowie der *Taq* RT zeigen keine klar abgegrenzten Banden, die mit der Laufkontrolle vergleichbar sind sondern unscharfe Signale. Die schwachen Banden verursacht durch die endogenen *E. coli* Proteine korrelieren mit der Hintergrundaktivität, die ebenfalls während der RT-Assays detektiert werden konnte, was eine gewisse Grundaktivität verursacht durch endogenen *E. coli* Proteine (4.1.2) verdeutlicht. Im Gegensatz dazu weist keine Probe der Negativkontrolle detektierbare Banden auf. Die Produkte der RT-Assays konnten durch diese Experimente als DNA identifiziert werden. Somit sind die verschiedenen RTs in der Lage RNA in cDNA zu transkribieren, auch wenn es deutliche Unterschiede in der Aktivität gibt.

### ***3.1.4.3 Weiterführende Untersuchungen der nRT-Aktivität mit anschließender Sequenzanalyse***

Nachdem die während des RT-Assays generierten Nukleinsäuren als DNA identifiziert werden konnte, wurden weiteren Aktivitätsversuchen durchgeführt, bei welchen im Anschluss eine Sequenzanalyse der DNA erfolgen sollte. Hierzu wurden RT-Assays ohne radioaktive Markierung durchgeführt. Anschließend wurden diese RT-Assayprodukte in RT-PCRs verwendet und deren Produkte mittels 1%iger Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein beispielhaftes Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Zu erkennen sind sehr starke Banden unterhalb der 0,5 kb Bande des Markers, welche durch die RT-Assayproben der M-MLV RT (1) und der Positivkontrolle der PCR (5) bedingt wurden. Die Proben der PCR-Negativkontrolle (6), sowie die der endogenen Proteine aus *E. coli* (4) zeigen keine Banden, während schwache Banden bei den Proben der nRT (2 und 3) zu erkennen sind. Somit konnte während der RT-Assays cDNA durch die M-MLV RT und nRT, wenn hierbei auch deutlich weniger, synthetisiert und anschließend mittels RT-PCR amplifiziert werden. Zudem sind in den Geltaschen der nRT-Proben sowie der endogenen *E. coli* Proteine Banden zu beobachten, welche vermutlich durch die hohe Konzentration von Proteinen und deren Aggregation mit DNA-Molekülen entstanden sind.



**Abbildung 15: RT-PCR im Anschluss an einen RT-Assay.** Die PCR-Produkte wurden mittels 1 %iger Agaroselektrophorese aufgetrennt, mit EtBr markiert und mit UV sichtbar gemacht. Als Matrize wurden die Produkte der vorherigen RT-Assays verwendet. Hierbei wurden die M-MLV RT (1), nRT mit N-terminalem 6x His-Tag (pKH3, 2), nRT mit C-terminalem 6x His Tag (pTS23, 3) und endogene *E. coli* Proteine (4) in die Reaktion eingesetzt bzw. die Plasmide pNZ004 oder pKH3 als Positivkontrolle (5) und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (6). Als Laufkontrolle wurde 1 kb DNA-Marker verwendet (DNA Ladder 1 kb, NEB).

Die PCR-Produkte der nRT, welche eine Bande nach der RT-PCR aufwiesen, wurden mittels Kit aufgereinigt (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey Nagel), anschließend sequenziert (LGC Genomics) und die Sequenzierergebnisse analysiert. Hierbei wurde vor allem nach spezifischen Adeninaustauschen im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten DNA gesucht. Jedoch konnten keine Adenin-spezifischen Austausche oder sonstige Änderungen der sequenzierten DNA im Vergleich zur eingesetzten DNA aufgefunden werden. In einigen Fällen konnte nach durchgeführter PCR eine deutlich stärkere Bande, welche von einer nRT generiert wurde, beobachtet werden. Hierbei konnte meist auch eine schwache oder vergleichbare Bande in den Proben der endogenen *E. coli* Proteine gefunden werden, wie auch bei einigen radioaktiv markierten RT-Assays beobachtet werden konnte. Um einen näheren Aufschluss über diese Banden zu erhalten wurden diese Proben ebenfalls mittels Sequenzierung analysiert. Im Falle einer möglichen Sequenzierung konnten auch hier keinerlei Änderungen oder Austausche im Vergleich zur ursprünglichen DNA-Matrize aufgefunden werden. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, wie diese Banden generiert wurden, vor allem da das Templatplasmid nach erfolgreicher IVT mittels denaturierender PAGE entfernt wurde. Hierzu wurden die Komponenten der IVT über eine denaturierende PAGE aufgetrennt, die Bande der synthetisierten RNA ausgeschnitten und aus dem Polyacrylamidgel gelöst. Da das Templatplasmid deutlich größer als die synthetisierte RNA ist, verbleibt das Plasmid in den Geltaschen, wodurch eine effiziente Trennung

von Templatplasmid und RNA gewährleistet wird. Abschließend legen die Ergebnisse der verschiedenen Aktivitätsassays eine Aktivität der nRT nahe, auch wenn die Aktivität und die Stabilität der RT niedrig sind. Vor allem weiterführende Optimierungen der Proteinstabilität sind für anschließende detailliertere Analysen der nRT unumgänglich.

### **3.1.5 Zusammenfassung der RT-Ergebnisse**

Die Analyse der RTs aus *Nostoc sp.* PCC 7120 und aus *Thermus aquaticus* gestaltete sich schwierig. Grund dafür waren unter anderem die problematische Expression, Aufreinigung und Löslichkeit, aber vor allem die niedrige Stabilität der RTs, wodurch die Reproduzierbarkeit der weiterfolgenden Analysen beeinträchtigt wurde. Dennoch war es möglich Reaktionen zu beobachten, die es nahelegen, dass die getesteten RTs die reverse Transkription von cDNA katalysieren können. Dass es sich dabei tatsächlich um DNA handelt, konnte mittels Verdau der radioaktiv markierten Assayprodukte nachgewiesen werden. Durch die Anwesenheit der nAvd konnte keine erhöhte nRT-Aktivität beobachtet werden, sodass ein Zusammenspiel der beiden Komponenten in diesen Versuchsreihen nicht bestätigt werden konnte. Die reverse Transkription war von beiden getesteten Matrizen (pKH2/PM151, TR-Sequenz aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR-System und pNZ004/TS49, aus dem eukaryotischen Retrotransposon UnaL2) möglich, sodass keine Sequenzspezifität beobachtet werden konnte. Zusätzlich konnte durch RT-Assays mit anschließender RT-PCR ein weiterer Nachweis für die Aktivität der nRT erbracht werden. In nachfolgenden Sequenzierungen waren jedoch keine Adenin-spezifischen Substitutionen oder andere Mutationen in der synthetisierten cDNA zu beobachten. Des Weiteren wurde in einigen Fällen eine gewisse Hintergrundaktivität beobachtet, welche durch die endogenen *E. coli* Proteine verursacht wurde. Die dabei synthetisierte cDNA war ebenfalls, teilweise in kürzeren DNA-Fragmenten, sequenzierbar. Abschließend konnte mit diesen verschiedenen Versuchsreihen ein erster wichtiger Grundsatznachweis für die Aktivität der nRT und *Taq* RT erbracht werden.

### **3.2 Untersuchung der akzessorischen variablen Determinante aus *Nostoc sp.* PCC 7120**

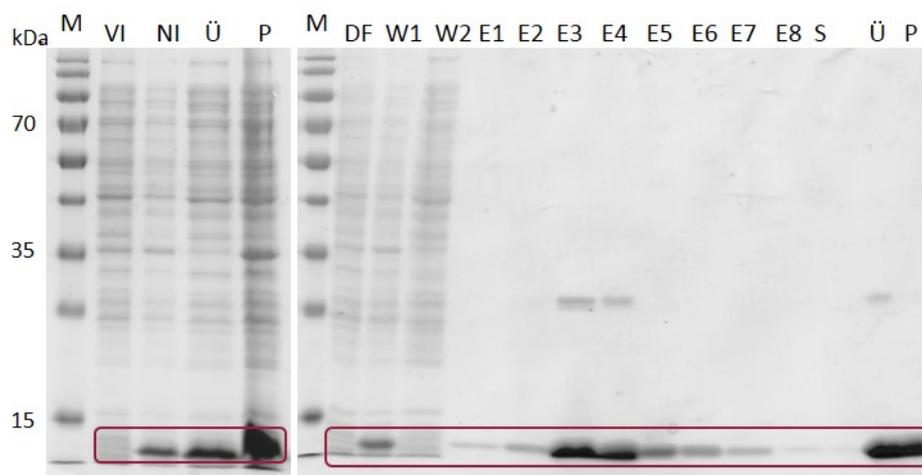
Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass die Avd für DGRs und deren Funktion essentiell ist (Doulatov et al., 2004; Medhekar und Miller, 2007), jedoch ist über die Aufgabe der Avd im DGR-System noch wenig bekannt. Daher wurde die Avd aus *Nostoc sp.* PCC 7120, kurz nAvd, rekombinant überexprimiert und aufgereinigt, sodass Charakterisierungsversuche wie Hybridisierungs-, Stabilitäts- und

Bindungsstudien durchgeführt werden konnten, um die Rolle der Avd innerhalb des DGR-Systems besser verstehen zu können.

In den folgenden Abschnitten sind die Oligosubstrate, welche mittels [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP am 5'-Ende markiert wurden mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.2.1 Rekombinante Überexpression und Aufreinigung der nAvd

Wie schon von Dr. Thomas Schillinger beschrieben, kann die nAvd sehr gut in *E. coli* rekombinant überexprimiert werden und zudem ist eine Aufreinigung über Nickel-NTA in hoher Konzentration und Reinheit möglich (Schillinger, 2013). Durch die anschließende Dialyse kann die nAvd im Lagerpuffer mehrere Monate aktiv gelagert werden. In Abbildung 16 sind die Überexpression, Aufreinigung und Dialyseproben einer nAvd Präparation beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 16: Überexpression, Aufreinigung und Dialyse der nAvd.** Die Teilproben vor und nach der Induktion (VI und NI), der Aufreinigungsproben mit Durchfluss (DF), der Waschstufen (W1-2), der Elutionsproben (E1-E8) und der Ni-Säule (S), sowie der Überstand- (Ü) und Pelletproben (P) nach der Dialyse wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Die nAvd (pTS30) ist durch dunkelrote Rechtecke markiert und unterhalb der 15 kDa Bande des Markers (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) zu erkennen.

Die Proteinbanden unterhalb der 15 kDa Bande des Markers, welche mit einem roten Rechteck markiert sind, entsprechen denen der nAvd. Zudem sind in den Aufreinigungsproben E3 und E4 sowie in dem Überstand der Dialyse (Ü) schwache Banden bei ca. 30 kDa erkennbar, welche möglicherweise durch eine Dimerbildung der nAvd entstanden sein könnten. Die hohe Ausbeute und Reinheit der nAvd nach der Dialyse ermöglichen nachfolgende biochemische Analysen.

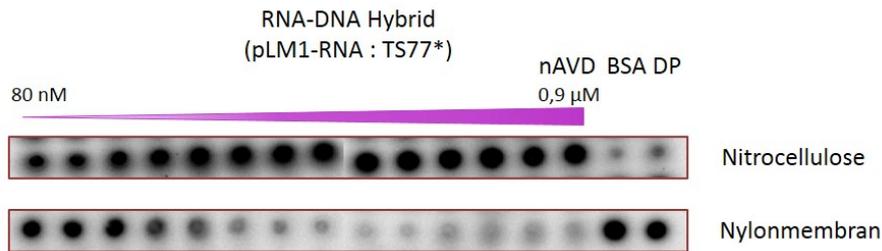
### 3.2.2 Das Bindungsverhalten verschiedener Nukleinsäuren durch die nAvd

Dr. Thomas Schillinger zeigte in seiner Arbeit über das Bindungsverhalten der nAvd, dass eine generelle Bindung von Nukleinsäuren an die nAvd möglich ist und dass die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ), also die Proteinkonzentration bei welchem die Hälfte des Substrates an die nAvd gebunden ist, bei DNA-Substraten und RNA/DNA-Hybriden unter 100-200 nM lag. Um einen besseren Überblick über Affinität und Bindungsverhalten der nAvd zu erhalten wurden in dieser Studie weitere detailliertere Versuche durchgeführt, bei welchen vor allem das Bindungsverhalten der nAvd bei Konzentrationen unter 200 nM untersucht wurde. Hierzu wurden Substrate mit verschiedenen Eigenschaften analysiert. Zum einen wurde die mutmaßliche Kreuz- (TS129\*: 134) bzw. Haarnadelstruktur (TS129\*: 130) am 3' Ende der VR aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR untersucht. Zum anderen wurde ein kontextfremdes doppelsträngiges DNA-Substrat (NZ116\*: NZ117) und das RNA/DNA-Hybrid (pLM1-RNA: TS77\*), welches wahrscheinlich die TR des DGR-Elements aus *Nostoc sp.* PCC 7120 darstellt, analysiert. Die untersuchten Strukturen sind im Detail in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Getestete Nucleinsäuresubstrate zur Analyse des Bindungsverhaltens der nAvd.** Analysiert wurden die Kreuzstruktur (A) und die Haarnadelstruktur (B) am 3' Ende der VR des *Nostoc sp.* PCC 7120 DGRs, eine kontextfremde dsDNA (C), sowie das RNA/DNA-Hybrid, welches die TR-RNA des DGR-Elements aus *Nostoc sp.* PCC 7120 darstellt (D). Der Leitstrang ist hierbei blau (DNA) bzw. lila (RNA) und der Folgestrang in grün (DNA) dargestellt.

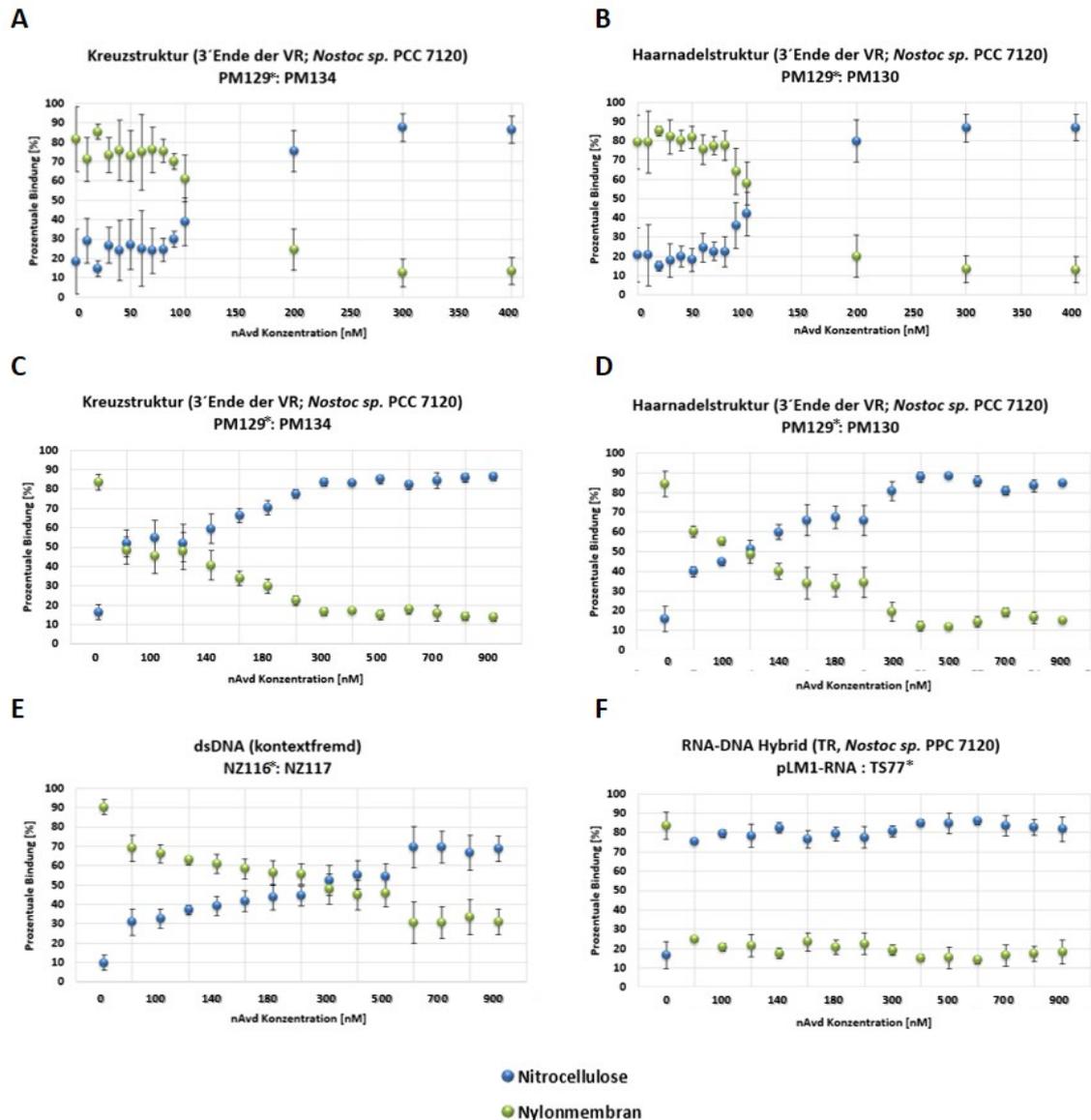
Bei den hier durchgeführten Filter-Binding-Assays (FBA; nach Wong und Lohman, 1993) sind Nucleinsäuren, welche an ein Protein wie die nAvd gebunden sind, nach einer gemeinsamen Inkubation und anschließendem Waschen an Nitrocellulose detektierbar, während ungebundene Nucleinsäuren, an der Nylonmembran gebunden werden. Ein beispielhaftes Ergebnis eines solchen FBAs ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Beispielhaftes Ergebnis eines Filter-Binding-Assays mit dem RNA/DNA-Hybrid pLM1-RNA und TS77\*.** Die radioaktiv markierten Nucleinsäuren mittels [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP am 5' Ende wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck sind die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 80 nM, 100 nM, 120 nM, 140 nM, 160 nM, 180 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM und 900 nM. Als Kontrolle wurde das denaturierte Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu$ M) und der Dialysepuffer (DP) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Der RNA/DNA Hybrid bestehend aus pLM1-RNA und TS77\* befand sich 12,5 nM in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd bzw. der Kontrollen gestartet und nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur abgestoppt. Die an die nAvd gebundenen Nucleinsäuren sind auf der Nitrocellulose zu sehen, während die ungebundenen Nucleinsäuren auf der Nylonmembran zu sehen sind. Es ist eine nAvd-spezifische Bindung in Abhängigkeit der nAvd-Konzentration zu erkennen.

Mit der Zunahme der nAvd-Konzentration ist ebenso eine Zunahme gebundener Nucleinsäuren erkennbar, während eine Abnahme der freien Nucleinsäuren zu beobachten ist. Die Kontrollen mit denaturiertem BSA bzw. Dialysepuffer, in welchem die nAvd gelagert wurde, zeigen hingegen den Großteil der Nucleinsäuren ungebunden an. Somit kann eine nAvd spezifische Bindung in Abhängigkeit der nAvd-Konzentration nachgewiesen werden.

Um einen Überblick über die Ergebnisse der vier verschiedenen getesteten Substrate zu erhalten wurden deren Mittelwerte sowie Standardabweichungen ermittelt; diese sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Auswertung der Filter-Binding-Assays mit steigender nAvd-Konzentration.** Analysen der Kreuzstruktur (A) und Haarnadelstruktur (B) 0 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM), sowie Analysen der Kreuzstruktur (C), der Haarnadelstruktur (D), einer kontextfremden dsDNA (E) und des RNA/DNA Hybrid (F) (80 nM, 100 nM, 120 nM, 140 nM, 160 nM, 180 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM). Hierzu wurde jeweils von 3-5 unabhängigen Assays das radioaktive Signal ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Intensität der Signale wurde mit der Software Image J ermittelt und der prozentuale Anteil (Nitrocellulose: blaue Punkte; Nylonmembran: grüne Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil der gebundenen Nukleinsäuren liegt zu Beginn (0 nM nAvd) zwischen 9 und 18 % und steigt bis zu einem Maximum von 70-88 % an.

Aus den ermittelten Bindungskurven kann die Dissoziationskonstante,  $K_d$ , direkt abgelesen werden. Sie gibt das Gleichgewicht einer Reaktion an; in diesem Fall, bei welcher Proteinkonzentration eine Bindung von 50 % der Substrate erreicht ist. Diese Ergebnisse, sowie die maximal gebundene Substratmenge der verschiedenen Versuchsreihen sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Errechnete Bindungsparameter der nAvd in Abhängigkeit verschiedener Substrate.** Dargestellt sind die aus den Diagrammen abgelesenen  $K_d$ -Werte. Zudem ist die maximal gebundene Substratmenge sowie die Standardabweichung zu sehen.

Substrat	$K_d$ -Wert [nM]	Maximal gebundene Substratmenge [%]
PM129*: PM134 Kreuzstruktur	80	86 ± 2,0
PM129*: PM130 Haarnadelstruktur	110-120	88 ± 1,2
NZ116*: NZ117 dsDNA	300-400	78 ± 8,5
pLM1-RNA : TS77* RNA/DNA-Hybrid	<80	86 ± 1,9

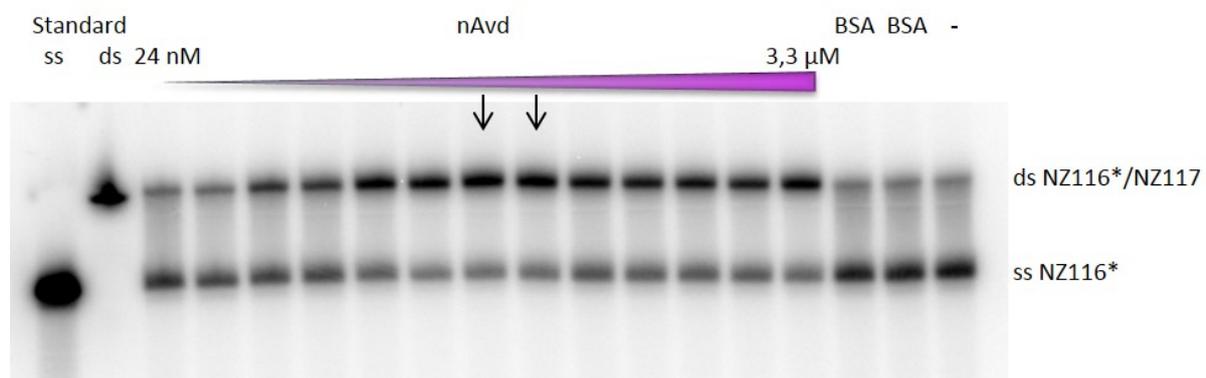
Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Dr. Thomas Schillinger, denn auch diese Versuchsreihen zeigen, dass vor allem das RNA/DNA-Hybrid mit 80 nM bzw. 100-200 nM (Schillinger, 2013) eine hohe Bindungsrate durch nAvd aufweist. Zur genaueren Analyse wurden weiterführend FBAs mit nAvd-Konzentrationen zwischen 10 nM und 100 nM durchgeführt, welche allerdings auf Grund von Degradierung der Substrate nicht ausreichend ausgewertet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls konnten zuvor gewonnene Ergebnisse zur Haarnadel- und Kreuzstruktur detailliert ergänzt werden. Hier wurde in Vorversuchen  $K_d$ -Werte zwischen 100-200 nM ermittelt (Pakebusch, 2014), welche nun auf 110-120 nM für die Haarnadelstruktur und 80 nM für die Kreuzstruktur spezifiziert werden konnten.

### 3.2.3 Hybridisierung diverser Nukleinsäuren durch die nAvd

Nachdem das Binden verschiedenster Nukleinsäuren an die nAvd nachgewiesen werden konnte (3.2.2) wurden weitere verwandte Funktionen untersucht. In vorherigen Studien konnten eine Helikase- und ATPase-Funktion der nAvd nicht nachgewiesen werden (Conrad, 2013; Schillinger, 2013). Jedoch konnte ein erster Hinweis auf eine mögliche Nukleinsäurechaperonaktivität gefunden werden. Um diesen Hinweis weiter zu untersuchen, wurde die nAvd auf die Hybridisierung diverser Substrate getestet. Dazu wurden Versuche (nach Martin und Bushman, 2001) durchgeführt, bei welchen zwei komplementäre Einzelstrangoligonukleotide zusammen mit der nAvd inkubiert wurden. Zur Detektion wurde einer der Stränge radioaktiv markiert. Hierbei konnte eine Hybridisierungsfunktion der nAvd nachgewiesen werden, welche abhängig von den Substraten variieren kann. Die Eigenschaften der verschiedenen Substrate sind in Tabelle 19 im Einzelnen aufgelistet. Alle getesteten Substrate, außer TS75 und TS76, sind dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR-System kontextfremd. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt.

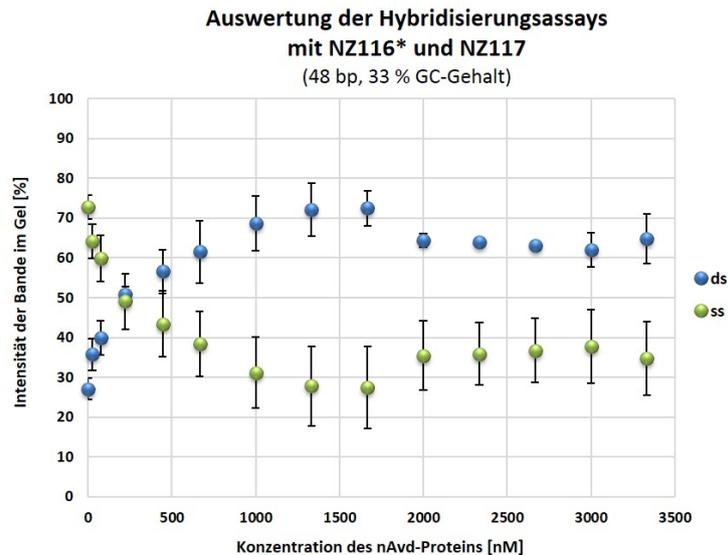
### 3.2.3.1 Analyse der AT-reichen Substraten NZ116 und NZ117

Da die Substrate NZ116 und NZ117 schon bei den Bindungsstudien nAvd untersucht wurden, wurde diese auch in Hybridisierungsversuchen analysiert. Die 48 bp langen Substrate weisen einen niedrigen GC-Gehalt auf (33 %, Tabelle 19) und sind dem DGR-System aus *Nostoc sp.* PCC 7120 kontextfremd. Ein beispielhafter Assay ist in Abbildung 20 dargestellt. Das lila Dreieck verdeutlicht die ansteigende nAvd-Konzentration, die in den Proben vorhanden war. Die Pfeile markieren die Proben mit 1,3  $\mu\text{M}$  und 1,6  $\mu\text{M}$  nAvd, bei welchen der höchste Doppelstranganteil vorlag. Der Doppelstrang- und Einzelstrangstandard dienen als Laufkontrolle. Zudem ist die Negativkontrolle (-) dargestellt, um den Doppelstranganteil in der Abwesenheit der nAvd zu verdeutlichen. Die BSA-Kontrollen zeigen den Doppelstranganteil in Anwesenheit des DNA-bindenden BSA, welches jedoch keine Hybridisierungsaktivität aufweist. Es ist zu erkennen, dass mit steigender nAvd-Konzentration der Doppelstranganteil zunimmt, bis ab einer Konzentration von 666 nM der Hauptteil der DNA doppelsträngig vorliegt. Bei den nAvd-Konzentrationen von 1,3  $\mu\text{M}$  und 1,6  $\mu\text{M}$  ist ein Maximum der Doppelstranganteile zu erkennen (ca. 80 %), welcher anschließend etwas abnimmt. Jedoch bleibt der Doppelstranganteil immer deutlich über 50 %. In allen drei Kontrollen liegt der Hauptteil der DNA als Einzelstrang vor (ca. 80 %).



**Abbildung 20: Hybridisierungsassay mit den Substraten NZ116\* und NZ117.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck werden die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ . Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$  und 3,3  $\mu\text{M}$ ) und Wasser (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die Einzelstränge NZ116\* und NZ117 befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd bzw. der Kontrollen gestartet und nach einer 2-minütigen Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Es ist eine nAvd-abhängige Zunahme des Doppelstranganteils zu erkennen. Die beiden Proben (1,3  $\mu\text{M}$  und 1,6  $\mu\text{M}$  nAvd), bei welchen der höchste Doppelstranganteil zu erkennen ist, sind mit schwarzen Pfeilen markiert. In den Negativkontrollen liegt der Hauptteil der DNA einzelsträngig vor.

Zur verdeutlichten Darstellung der Ergebnisse wurden 5 Hybridisierungsassays ausgewertet. Diese Auswertung ist in Abbildung 21 dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert der Bandenintensität in Prozent in Abhängigkeit der nAvd-Konzentration (0 nM bzw. 24 nM- 3,3  $\mu$ M) im Ansatz, sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert. Hierbei ist zu erwähnen, dass ein kleiner DNA-Anteil bei allen Proben, auch bei allen folgenden Substraten, in der Geltasche aufgefunden wurde. Dieser Anteil nahm mit der nAvd-Konzentration meist etwas zu und lag im Schnitt bei ca. 10 %. Diese DNA ist vermutlich an einen nAvd-Komplex gebunden und daher zu groß um in das Gel einzulaufen. Diese Daten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Diagrammen enthalten. Die blauen Punkte im Diagramm stellen den prozentualen Anteil der doppelsträngigen DNA dar, während die grünen Punkte den prozentualen Anteil der einzelsträngigen DNA wiedergeben. Zu Beginn ohne Zugabe der nAvd sind 27 % Doppelstrang in der Reaktion vorhanden. Dieser Anteil steigt stetig an bis bei einer nAvd-Konzentration von 222 nM 50 % des Substrates doppelsträngig vorliegen. Anschließend nimmt der Doppelstranganteil bis zu einem Maximum von 72 % bei 1,3  $\mu$ M bzw. 1,6  $\mu$ M nAvd weiter zu. Ab einer nAvd-Konzentration von 2  $\mu$ M bis 3,3  $\mu$ M liegt der Doppelstranganteil auf einem stabilen Niveau von 62-64,8 %. Somit kann hier ein Hybridisierungsoptimum bei einer nAvd-Konzentration von 1,3 bis 1,6  $\mu$ M festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen hingegen scheinen die katalytischen Eigenschaften der nAvd vermindert im Vergleich zu Optimum. Die Standardabweichungen liegen bei den Doppelstranganteilen zwischen 0,5 % bis 7,8 %, während bei den Einzelstranganteilen generell eine höhere Standardabweichung von 3 % bis 10,2 % erreicht wird. Möglicherweise werden von den oben beschriebenen nAvd-Komplexen vor allem ssDNA gebunden, was zu Schwankungen und somit zu leichten Erhöhungen der Standardabweichung führen könnte.



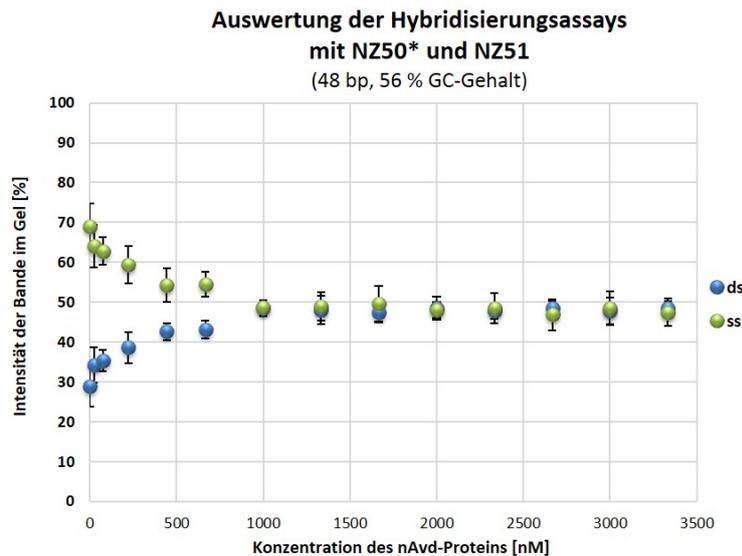
**Abbildung 21: Auswertung der Hybridisierungsassays mit NZ116\* und NZ117.** Hierzu wurden von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd (0 nM, 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu$ M, 1,6  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 2,3  $\mu$ M, 2,6  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 3,3  $\mu$ M) sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt zu Beginn (0 nM nAvd) bei 27 % und steigt zu einem Maximum von ca. 72 % bei einer nAvd-Konzentration von 1,3 bzw. 1,6  $\mu$ M an. Diese Versuchsreihe wurde von Christine Pakebusch durchgeführt.

Somit ist die nAvd in der Lage den Doppelstranganteil der Substrate NZ116\* und NZ117 zu erhöhen. Die Kontrollen, in welchen BSA enthalten waren, wiesen im Mittel einen Doppelstranganteil von je 29,7 % auf.

### **3.2.3.2 Analyse der Substrate NZ50 und NZ51 zur Untersuchung der Auswirkung des GC-Gehaltes**

In diesem Versuchsaufbau sollte untersucht werden, ob der GC-Gehalt eines Substrates einen Einfluss auf die Hybridisierungsaktivität der nAvd hat. GC-reiche Substrate sind für viele Enzyme erschwert zu hybridisieren und durch die hohe Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen auch erschwert zu trennen (Wood et al., 1985; Yakovchuk et al., 2006). Die Substrate NZ50 und NZ51 weisen mit 48 bp die gleiche Länge wie NZ116 und NZ117 auf, jedoch ist ihr GC-Gehalt deutlich höher (33 % NZ116/ NZ117; 56 % NZ50/ NZ51; Tabelle 19), sodass mit diesem Versuch ein direkter Vergleich zu den AT-reichen Substraten NZ116 und NZ117 angestellt werden kann. Auch hier wurde eine Auswertung von 5 Hybridisierungsassays angefertigt, die in Abbildung 22 gezeigt ist, wobei alle Parameter wie in Abbildung 21 sind. Zu Beginn, ohne Zugabe von nAvd, liegt der Doppelstranganteil bei 29 %. Dieser Anteil steigt in Abhängigkeit der nAvd-Konzentration an, sodass bei einer nAvd-Konzentration von

24 nM 34 % der DNA doppelsträngig vorliegen. Ab einer nAvd-Konzentration von 1  $\mu$ M wird ein stabiles Niveau mit einem Doppelstranganteil von ca. 48 % erreicht. Dieser Prozentsatz bleibt bei den weiteren Messpunkten mit 47,5 % bis 48,5 % annähernd gleich. Im Vergleich zu NZ116 und NZ117 kann hier keine Abnahme des Doppelstranganteils bei höheren nAvd-Konzentrationen beobachtet werden. Die Standardabweichungen der Doppelstrang- und Einzelstranganteile liegen zwischen 1,7 % und 5,7 %.



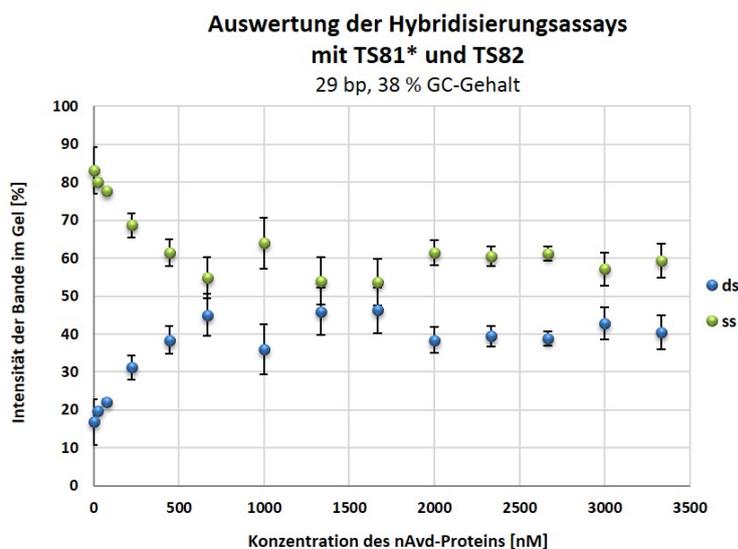
**Abbildung 22: Auswertung der Hybridisierungsassays mit NZ50\* und NZ51.** Hierzu wurden von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd (0 nM, 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu$ M, 1,6  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 2,3  $\mu$ M, 2,6  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 3,3  $\mu$ M) sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt zu Beginn (0 nM nAvd) bei 29 % und steigt zu einem Maximum von 48,5 % ab einer nAvd-Konzentration von 999 nM an.

Generell ist die nAvd in der Lage den Doppelstranganteil der Substrate NZ50 und NZ51 bis um 20 % zu erhöhen. Die Kontrollen, in welchen BSA enthalten war, wiesen im Mittel einen Doppelstranganteil von 29 % bzw. 30 % bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M bzw. 3,3  $\mu$ M BSA auf.

Im Vergleich zu den Substraten NZ116 und NZ117 ist hier ein geringerer Anstieg des Doppelstranganteils in Abhängigkeit der nAvd mit 20 % zu 45 % bei einer ähnlichen Ausgangssituation von 29 % bzw. 27 % Doppelstranganteil zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des GC-Gehalts der Substrate von 33 % auf 56 % die Hybridisierungsaktivität der nAvd stark beeinflusst.

### ***3.2.3.3 Analyse der AT-reichen Substrate TS81 und TS82 zur Untersuchung der Auswertung der Substratlänge***

Auch die Länge von Substraten spielt für die Aktivität von Enzymen eine wichtige Rolle. Viele Enzyme benötigen eine Mindestanzahl von Nukleotiden, um diese optimal binden zu können (Tsuchihashi und Brown, 1994). Daher wurde analysiert, ob die Substratlänge einen Einfluss auf die Hybridisierungsaktivität der nAvd hat. Hierzu wurden die 29 bp langen Substrate TS81 und TS82 untersucht, die mit 38 % einen ähnlichen GC-Gehalt wie die Substrate NZ116 und NZ117 (33 %) aufweist. Somit können die Daten aus diesen Versuchen direkt mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit dem 48 bp langen Substrat NZ116 und NZ117 verglichen und Rückschlüsse auf die Auswirkung der Länge der Substrate gezogen werden. Dazu wurde hier eine Auswertung von 3 Hybridisierungsassays angefertigt, die in Abbildung 23 gezeigt ist, wobei alle Parameter wie in Abbildung 21 sind. Zu Beginn, ohne Zugabe von nAvd, liegt der prozentuale Doppelstranganteil bei 17 %. Dieser Anteil steigt abhängig von der nAvd-Konzentration stetig an, bis bei einer nAvd-Konzentration von 1,3 bzw. 1,6  $\mu\text{M}$  das Maximum von 46 % erreicht ist, wobei der Messwert bei einer nAvd-Konzentration von 999 nM als Ausreiser einzuordnen ist. In dieser Versuchsreihe ist, ähnlich wie bei den Versuchen mit NZ116 und NZ117, nach dem Maximum bei 1,3  $\mu\text{M}$  und 1,6  $\mu\text{M}$  nAvd eine leichte Abnahme des Doppelstranganteils zu erkennen mit einem stabilen Niveau des Doppelstranganteils von 38 % bis 43 % bei den nAvd-Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  bis 3,3  $\mu\text{M}$ . Die Standardabweichung liegt zwischen 0,7 % bis 6,7 %.



**Abbildung 23: Auswertung der Hybridisierungsassays mit TS81\* und TS82.** Hierzu wurden von 3 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd (0 nM, 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ ) sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt zu Beginn (0 nM nAvd) bei 16,7 % und steigt zu einem Maximum von 46 % bei einer nAvd-Konzentration von 1,3 bzw. 1,6  $\mu\text{M}$  an. Diese Versuchsreihe wurde von Christine Pakebusch durchgeführt.

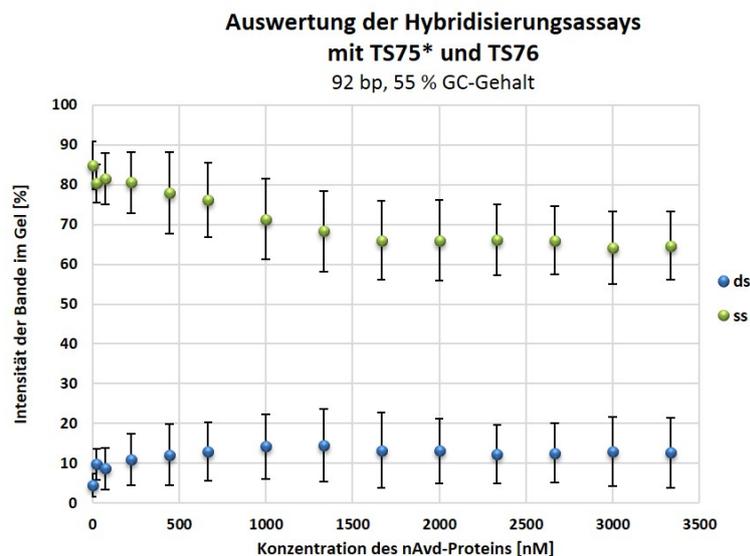
Die nAvd ist ebenfalls in der Lage den Doppelstranganteil der Substrate TS81 und TS82 zu erhöhen. Die Kontrollen, in welchen BSA enthalten waren, wiesen im Mittel einen Doppelstranganteil von 16 % auf.

Im Vergleich zu NZ116 und NZ117 ist hier ein geringerer Anstieg des Doppelstranganteils mit 29 % zu 46 % zu erkennen. Die Ausgangssituation mit 17 % Doppelstranganteil liegt etwa 10 % unter der der Versuche mit NZ116 und NZ117. Diese kann einen ersten Hinweis darauf geben, dass diese Substrate weniger zur Selbsthybridisierung neigen und somit generell weniger gut zu hybridisieren sind.

### ***3.2.3.4 Analyse zur Auswirkung der Hybridisierungsaktivität der nAvd auf sehr lange Substrate sowie auf RNA/DNA-Hybridisierung***

In einer Studie über das Nucleocapsid aus HIV-1 konnte eine besonders hohe Hybridisierungsrate bei überdurchschnittlich langen Substraten gezeigt werden (Tsuchihashi und Brown, 1994). In Anlehnung an diese Erkenntnis wurden die 92 bp langen Substrate TS75 und TS76 analysiert, welche mit 55 % einen erhöhten AT-Gehalt aufweisen. Auch diese Versuchsreihe kann anschließend mit den zuvor gewonnenen Ergebnissen verglichen werden. Dazu wurde eine Auswertung von 5 Hybridisierungsassays

angefertigt, die in Abbildung 24 gezeigt ist, wobei alle Parameter wie in Abbildung 21 sind. Der prozentuale Doppelstranganteil von TS75 und TS76 liegt ohne Zugabe der nAvd bei 4,5 %. Dieser Anteil steigt in Abhängigkeit der nAvd auf ein Maximum von 14,5 % bei einer nAvd-Konzentration von 1,3  $\mu\text{M}$  an. Anschließend nimmt auch hier der Anteil wieder leicht ab und verbleibt bei den folgenden Konzentrationen bei 12,3 % bis 13,2 %. Die Standardabweichungen der Doppelstranganteile liegen zwischen 4,5 % bis 10,2 %, während bei den Einzelstranganteilen etwas niedrigere Werte von 2,8 % bis 8,4 % erreicht werden. Im Vergleich zu der prozentualen Zunahme des Doppelstranganteils ist die Standardabweichung sehr hoch, was eine sichere Interpretation der Ergebnisse erschwert. Trotzdem ist die nAvd in der Lage den Doppelstranganteil der Substrate TS75 und TS76 zu erhöhen. Die Kontrollen, in welchen BSA enthalten waren, wiesen im Mittel einen Doppelstranganteil von 4,9 % bzw. 4,7 % auf.

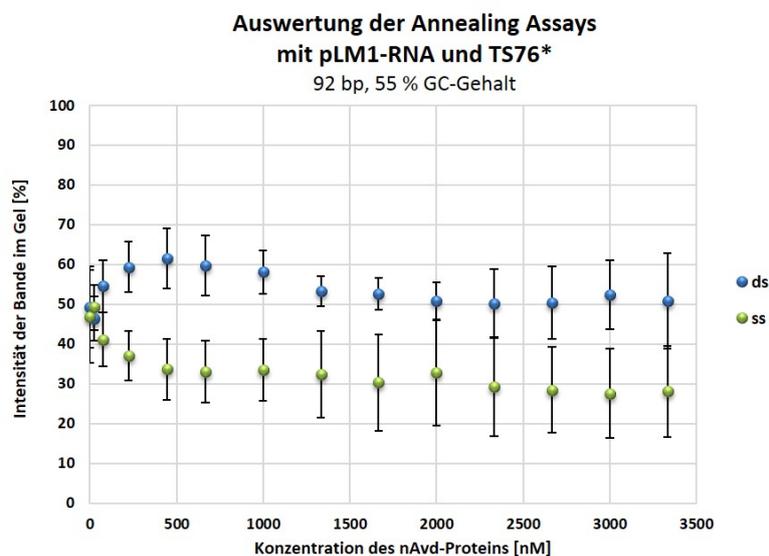


**Abbildung 24: Auswertung der Hybridisierungsassays mit TS75\* und TS76.** Hierzu wurde von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd (0 nM, 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ ) sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt zu Beginn (0 nM nAvd) bei 4,5 % und steigt zu einem Maximum von 14,5 % bei einer nAvd-Konzentration von 1,3  $\mu\text{M}$  an.

Im Vergleich dieser Versuchsreihe mit den anderen getesteten Substraten, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen, denn hier sind sowohl der Doppelstrang zu Beginn als auch das Hybridisierungsmaximum sehr niedrig und liegen auf dem Level der Ausgangssituation der anderen Hybridisierungsversuche. Auch hier gibt die niedrige Ausgangssituation mit 4,5 % Doppelstranganteil

einen ersten Hinweis darauf, dass dieses Substrat weniger zur Selbsthybridisierung neigt und somit generell schlechter hybridisiert.

Da die Bindungsstudien Hinweise auf eine hohe Affinität der nAvd auf RNA/DNA-Hybride zeigen, wurden die pLM1-RNA, welche für die TR des DGRs aus *Nostoc sp.* PCC 7120 kodiert, und das Oligonukleotid TS76 in Hybridisierungsversuchen analysiert. Hierbei konnte eine Erhöhung des Doppelstranganteils von 56,9% auf 61,5 % festgestellt werden (Abbildung 25). Im Vergleich zu den Hybridisierungsversuchen mit TS75 und TS76 ist das Ausgangsniveau des Doppelstranganteils mit knapp 50 % höher, was auf eine starke Neigung zur Selbsthybridisierung hindeutet; jedoch wurde mit knapp 15 % eine vergleichbare Erhöhung des Doppelstranganteils erreicht.



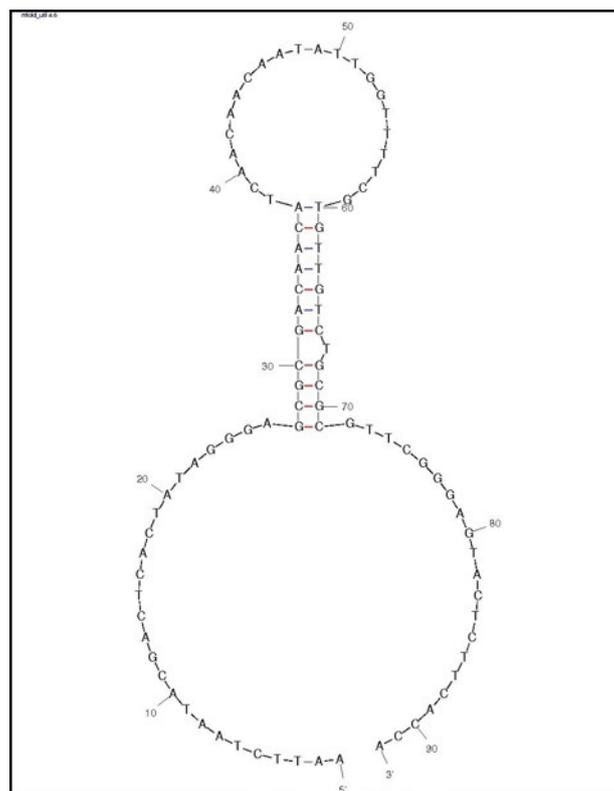
**Abbildung 25: Auswertung der Hybridisierungsassays von TR-RNA (pLM1) und TS76\*.** Hierzu wurden von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Konzentrationen der nAvd (0 nM, 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3 µM, 1,6 µM, 2 µM, 2,3 µM, 2,6 µM, 3 µM, 3,3 µM) sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) ermittelt. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt zu Beginn (0 nM nAvd) bei 46,9 % und steigt zu einem Maximum von 61,5 % bei einer nAvd-Konzentration von 444 nM an.

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die 92 bp langen Substrate die Hybridisierungsaktivität der nAvd verglichen mit den anderen Substraten sehr stark beeinflussen und um bis zu 57 % reduzieren. Dieser verhältnismäßig kleine Anteil ist zum einen auf die komplizierte Struktur der beiden zu hybridisierenden Moleküle zurückzuführen, was im folgenden Abschnitt detaillierter erläutert wird (3.2.4). Zum anderen ist dieses Substrat mit 92 bp extrem lang. Nicht nur die Länge selbst, aber auch die Bewegung der Moleküle in der Reaktion erschweren die Hybridisierung und die Stabilität sehr.

Trotzdem ist die nAvd befähigt die Hybridisierung von diesen Substraten, auch unter erschwerten Bedingungen, zu katalysieren.

### 3.2.4 Eine Strangaustauschaktivität der nAvd konnte nicht nachgewiesen werden

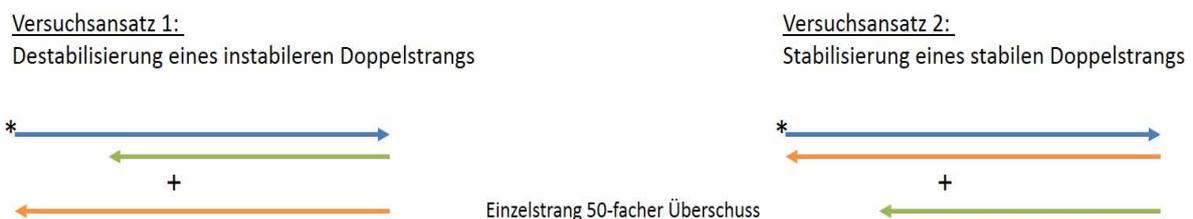
Wie in Abbildung 24 gezeigt, ist die nAvd in der Lage die 92 bp Substrate TS75 und TS76 zu hybridisieren. Hierzu ist es jedoch zuerst notwendig die Sekundärstruktur von TS75 und TS76 zu lösen, da TS75 und TS76 als Einzelstrang eine Y-Struktur ausbilden (Abbildung 26), bei welcher der Strang teilweise mit sich selbst hybridisiert ist. Aus diesem Grund gelangt bei einer nativen PAGE, bei welcher die Strukturen erhalten bleiben, der Einzelstrang weniger schnell durch das Gel und ist oberhalb des Doppelstrangs erkennbar (vgl. Anhang, Abbildung 37).



**Abbildung 26:** Über das Programm MFold errechnete Sekundärstruktur von TS75 im vorherrschenden Milieu während des Nucleinsäurechaperonsassays.  $\Delta G$ : -5,8; (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

Um nun eine Hybridisierung mit einer komplementären Nucleinsäure zu katalysieren muss ein Lösen oder Lockern der Struktur erfolgen. Dass ein Lösen der Struktur und eine anschließende Hybridisierung von TS75 und TS76 stattfindet, konnte mit dem Anstieg von 4,5 % in der Negativkontrolle auf bis zu

14,5 % (1,3  $\mu$ M nAvc) Doppelstranganteil gezeigt werden (Abbildung 24). Dieser verhältnismäßig kleine Anteil ist zum einen auf die komplizierte Struktur der beiden zu hybridisierenden Oligonukleotide zurückzuführen, denn beide Oligonukleotide bilden eine Y-Struktur aus. Zum anderen wirken sich die Länge des Substrates, sowie die Bewegung der Moleküle auf die Hybridisierung und Stabilität der Substrate aus. Dessen ungeachtet ist die nAvc in der Lage die Hybridisierung von TS75 mit TS76, auch unter erschwerten Bedingungen, zu katalysieren. Zur Untersuchung, ob das Lösen der Struktur von der nAvc katalysiert wird oder ein zufälliges Ereignis ist wurde in weiterführenden Versuchen getestet, ob die nAvc in der Lage ist einen Strangaustausch zwischen einem Doppelstrang und einem Einzelstrang zu katalysieren. Viele Enzyme, die einen Strangaustausch katalysieren, hybridisieren den stabilsten Doppelstrang, also den Doppelstrang mit der maximalen Anzahl an komplementären Basenpaaren, indem sie die perfekt hybridisierten Basenpaare erkennen und stabilisieren. Dazu wurde in einem Versuchsansatz ein instabilerer Doppelstrang, mit einem hohen Überschuss von einem Einzelstrang inkubiert, welcher zu einer Bildung eines stabileren Doppelstrangs führen konnte. Mit diesen Versuchen wurde somit getestet, ob die nAvc die Bildung eines stabileren Doppelstrangs unterstützt, indem sie einen instabileren Doppelstrang destabilisiert. Außerdem wurde in einem zweiten Versuchsansatz ein stabiler Doppelstrang mit einem hohen Überschuss von einem Einzelstrang inkubiert, welcher zu einer Bildung eines instabileren Doppelstrangs führen konnte. Mit diesem Gegenversuch wurde untersucht, ob die nAvc einen stabilen Doppelstrang unter kompetitiven Bedingungen stabilisiert. Der instabilere Doppelstrang besteht aus zwei komplementären Strängen, wobei einer der Stränge kürzer als der andere ist. Der stabile Doppelstrang besteht hingegen aus zwei komplementären gleichlangen Strängen. Die beiden Versuchsansätze sind in Abbildung 27 schematisch dargestellt.

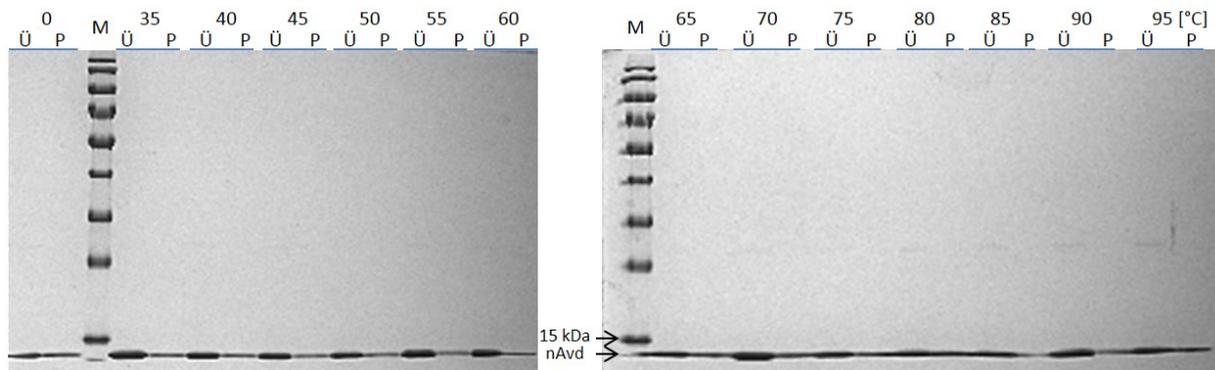


**Abbildung 27: Schematischer Versuchsaufbau der Strangaustauschversuche.** Im Versuchsansatz 1 wurde ein instabilerer Doppelstrang mit einem Einzelstrang, der zur Ausbildung eines stabileren Doppelstrangs führen kann, inkubiert und somit getestet, ob die nAvc die Destabilisierung eines instabileren Doppelstrangs unterstützt. Im Versuchsansatz 2 wurde ein stabilerer Doppelstrang mit einem Einzelstrang, der zur Ausbildung eines instabileren Doppelstrangs führen kann, inkubiert und somit getestet, ob die nAvc die Stabilisierung eines stabilen Doppelstrangs unterstützt. Die blauen Pfeile stellen das radioaktiv markierte Oligonukleotid (\*) dar, welches in beiden Versuchsansätzen zur Ausbildung des Doppelstrangs verwendet wurde. Die grünen Pfeile stellen das kürzere komplementäre Oligonukleotid dar, welches zur Ausbildung des instabileren Doppelstrangs verwendet wurde. Die orangefenen Pfeile stellen das komplementäre Oligonukleotid dar, welches zur Ausbildung eines stabilen Doppelstrangs verwendet wurde. Die Einzelstränge wurden jeweils im 50-fachen Überschuss im Vergleich zum Doppelstrang in die Reaktion gegeben.

In dem Versuchsansatz 1 wurden NZ116/LJ117 mit NZ117 bzw. TS81/TS83 mit TS82 verwendet, während im Versuchsansatz 2 NZ116/NZ117 mit LJ117 bzw. TS81/TS82 mit TS83 analysiert wurden (Tabelle 19). Dazu wurden nAvd-Konzentrationen von 24 nM bis 3,3  $\mu$ M sowie Inkubationszeiten von 2 Minuten und 15 Minuten getestet. Außerdem wurde neben dem Annealing-Puffer auch Chaperon-Reaktionspuffer (2.1.2.1 und 2.2.3.3) verwendet. In keinem der durchgeführten Versuche konnte eine nAvd-spezifische Reaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt, die Versuche wurden teilweise von M.Sc. Christine Pakebusch im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.). Möglicherweise könnte durch weitere Optimierung des Versuchsaufbaus ein Austausch nachgewiesen werden. Falls die nAvd nicht in der Lage sein sollte einen Strangaustausch zu katalysieren, könnte das oben beschriebene Lösen der Struktur über Dissoziation erfolgen und wäre somit nAvd-unabhängig. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die niedrige Hybridisierung von TS75 und TS76 darstellen, da die Reaktion von einer spontanen Dissoziation abhängig wäre.

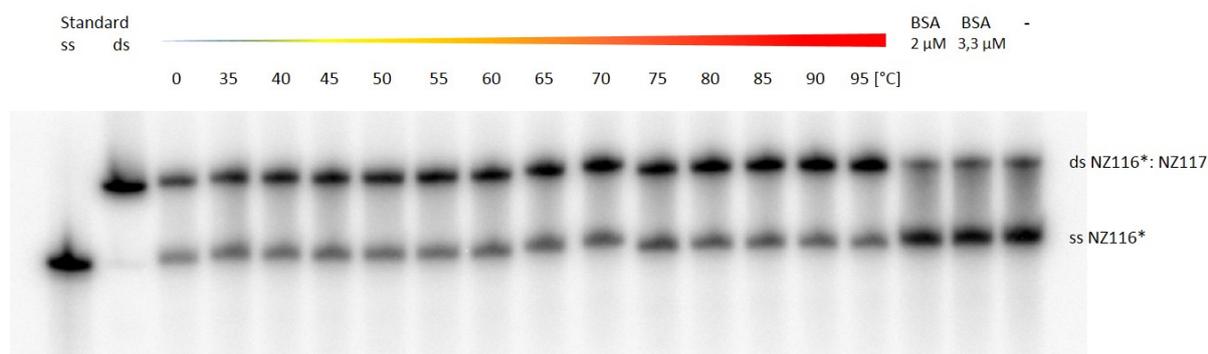
### 3.2.5 Die nAvd weist eine hohe Thermostabilität auf

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von DGRs in der Gattung *Nostoc* könnte die Anpassung an Umwelteinflüssen wie Hitzestress sein. Um dies weiter zu untersuchen wurden Thermostabilitätsversuche der nAvd und anschließende Nukleinsäurechaperonassays (nach Martin und Bushman, 2001) durchgeführt. Mit diesen Stabilitätsassays kann analysiert werden, inwiefern die nAvd in der Lage ist Hitzestress zu tolerieren und sich anzupassen. Hierzu wurden nAvd-Aliquots bei Temperaturen von 0 °C bis 95 °C inkubiert und anschließend bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, sodass die denaturierten Proteine ausfielen und nur die nativen und löslichen Proteine im Überstand zu finden waren. In Abbildung 28 sind die einzelnen Fragmente dieses Versuchsaufbaus nach 12 %iger SDS-PAGE dargestellt. Die deutlich erkennbaren Banden unterhalb der 15 kDa Bande des Markers (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) entsprechen der nAvd, welche eine relative Molekülmasse von 14,55 kDa aufweist. Wie zu erkennen ist, befindet sich in allen Proben (0-95 °C) der größte Anteil der nAvd im Überstand (Ü) und liegt somit im nativen Zustand vor. In den Pelletproben (P) ist ebenfalls ein Anteil der nAvd zu beobachten. Somit fällt ein gewisser Anteil unabhängig der Inkubationstemperatur aus. Ob dies durch die Zentrifugation oder schon davor geschehen ist, konnte nicht analysiert werden.



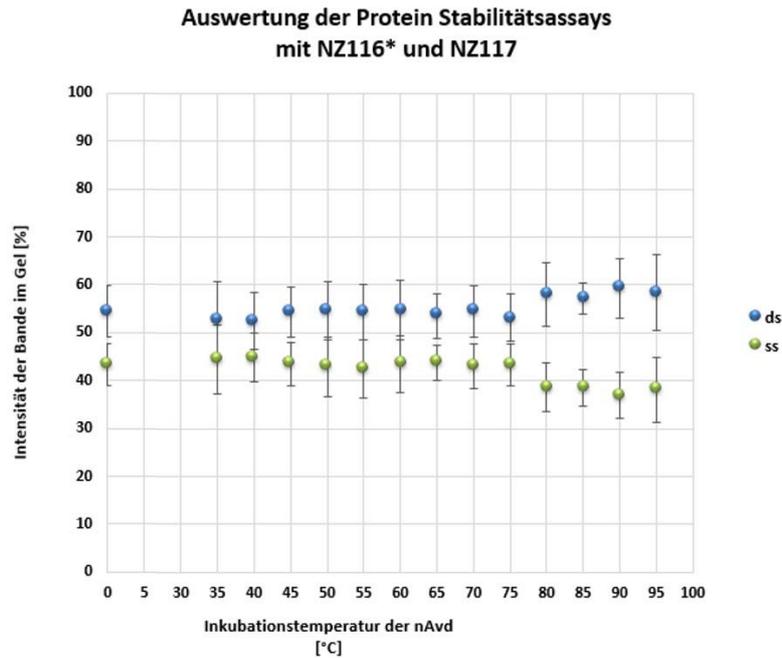
**Abbildung 28: Ergebnis eines nAve-Stabilitätstests nach Inkubation der nAve bei 0 °C und 35 °C- 95 °C in 5 °C Schritten.** Anschließend folgte eine Zentrifugation und die Trennung von Überstand und Pellet. Die Proben wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau eingefärbt. Die deutlichen Banden unter der 15 kDa Bande des Proteinmarker (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) entsprechen der nAve (14,55 kDa). Die blauen Linien markieren jeweils die zusammengehörigen Überstand- und Pelletproben (Ü und P) einer Inkubationstemperatur. Bei allen Inkubationsproben befindet sich mindestens die Hälfte der Proteine im Überstand.

Mit den löslichen Proteinproben wurden Nukleinsäurechaperonassays durchgeführt. Dazu wurden 1,3  $\mu\text{M}$  nAve, welche zuvor bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden, bei 37 °C mit den ss-Substraten NZ116 und NZ117 inkubiert (2.2.3.2, 3.2.3). Zudem wurden Reaktionen mit 2  $\mu\text{M}$  bzw. 3,3  $\mu\text{M}$  BSA statt nAve, sowie ohne Protein (-) durchgeführt. In Abbildung 29 ist beispielhaft ein solcher Assay dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in allen Proben, in welchen die nAve enthalten ist, deutlich über die Hälfte der DNA doppelsträngig vorliegt und ein stabiles Niveau gehalten wird. Dabei macht es kaum einen Unterschied bei wieviel Grad Celsius die nAve zuvor erhitzt wurde, was durch das farbige Dreieck verdeutlicht wird. Als Laufkontrollen wurden ds NZ116\*: NZ117 und ss NZ116 verwendet. Während der 37 °C-Inkubation des Nukleinsäurechaperonassays hybridisiert die nAve zuverlässig komplementäre ss-Oligonukleotide, unabhängig der vorherigen Inkubationstemperaturen von 0 °C bzw. 35 °C- 95 °C in 5 °C Schritten. Im Gegensatz dazu zeigen die BSA-Kontrollen und die Kontrolle ohne Protein (-), dass ein Großteil der DNA einzelsträngig vorliegt und somit nicht hybridisiert wurde, auch wenn ein gewisser Anteil als Doppelstrang erkennbar ist.



**Abbildung 29: Protein-Stabilitätsanalyse mittels eines Nukleinsäurechaperonassays mit NZ116\* und NZ117 nach Inkubation der nAvd bei 0 °C und 35 °C- 95 °C.** Die Auftrennung der Proben sowie der Standards ss NZ116\* und ds NZ116\*: NZ117 erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das farbige Dreieck werden die aufsteigenden Inkubationstemperaturen der nAvd (1,3 µM) vor der Durchführung des Assays dargestellt: 0 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C. Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2 µM und 3,3 µM) und kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die beiden komplementären Einzelstränge NZ116\* und NZ117 befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd bzw. der Kontrollen gestartet und nach einer 2-minütigen Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Der Großteil der DNA liegt in den Proben, in welchen nAvd enthalten ist, doppelsträngig vor, während die Kontrollen einen Hauptanteil von ssDNA aufweisen. Dieser Effekt der nAvd ist von der vorherigen Inkubationstemperatur unabhängig.

Somit konnte durch die an die Hitzeinkubation anschließenden Nukleinsäurechaperonassays gezeigt werden, dass die nAvd nach Erhitzung bis 95 °C nicht nur stabil sondern auch aktiv bleibt. Um dies weiter zu verdeutlichen wurden die Bandenintensitäten von 5 Protein-Stabilitätsassays mit dem Computerprogramm Image Quant TL (GE Healthcare) ausgewertet, die prozentualen Doppelstrang- und Einzelstranganteile errechnet und die Standardabweichung ermittelt (Abbildung 30).

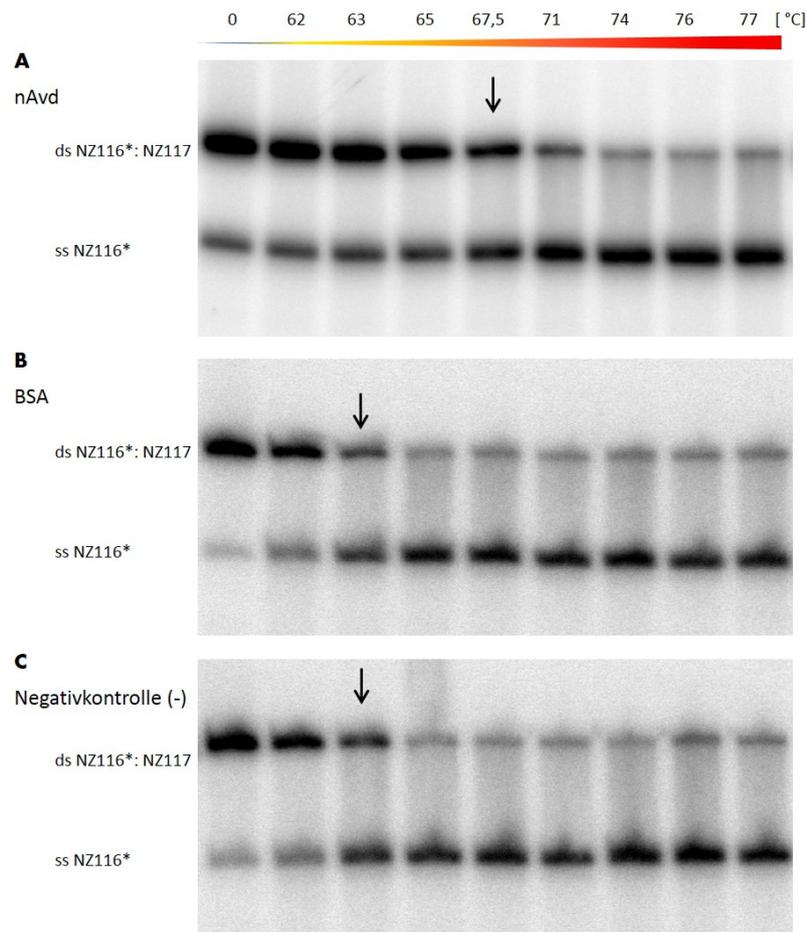


**Abbildung 30: Auswertung der Protein-Stabilitätsassays nach Erhitzen der nAvd** von 35 °C- 95 °C in 5 °C Schritten sowie nicht erhitzt (0 °C). Hierzu wurden von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss grüne Punkte, ds blaue Punkte) errechnet. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert bei den einzelnen Inkubationstemperaturen der nAvd sowie die Standardabweichung von diesem Mittelwert (StabWN-Funktion, Excel) errechnet. Der prozentuale Anteil des Doppelstrangs liegt bei allen Proben zwischen 52,6 % und 59,3 %.

In Abbildung 30 ist die Auswertung der Protein-Stabilitätsassays dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei allen Proben ein ähnlicher Prozentsatz von gebildetem Doppelstrang mit 52,6 %- 59,3 % erreicht wird. Bei einer nAvd-Konzentration von 1,3  $\mu$ M wird bei einer vorherigen Inkubationstemperatur von 0 °C bei einem anschließenden Nukleinsäurechaperonassay ein Doppelstranganteil von 54,4 % gebildet. Dieser Anteil bleibt bis zur 75 °C-Probe auf einem ähnlichen Niveau und steigt ab einer Inkubation bei 80 °C um etwa 7 % an. Das Maximum wird bei 59,3 % bei einer Inkubation von 90 °C erreicht. Die Standardabweichung befindet sich bei allen gemessenen Punkten zwischen 2 % und 7,8 %. Die Negativkontrollen sind in diesem Diagramm aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt. Alle drei Negativkontrollen wiesen im Mittel einen Doppelstranganteil von 37,6 % bis 40 % und einen Einzelstranganteil von 56,8% bis 59,5 % auf. Somit kann eine nAvd-abhängige Hybridisierung beobachtet werden, die unabhängig der vorherigen Inkubationstemperaturen von bis zu 95 °C ist.

### 3.2.6 Die nAvd ist in der Lage die Schmelztemperatur von doppelsträngigen Nukleinsäuren zu erhöhen

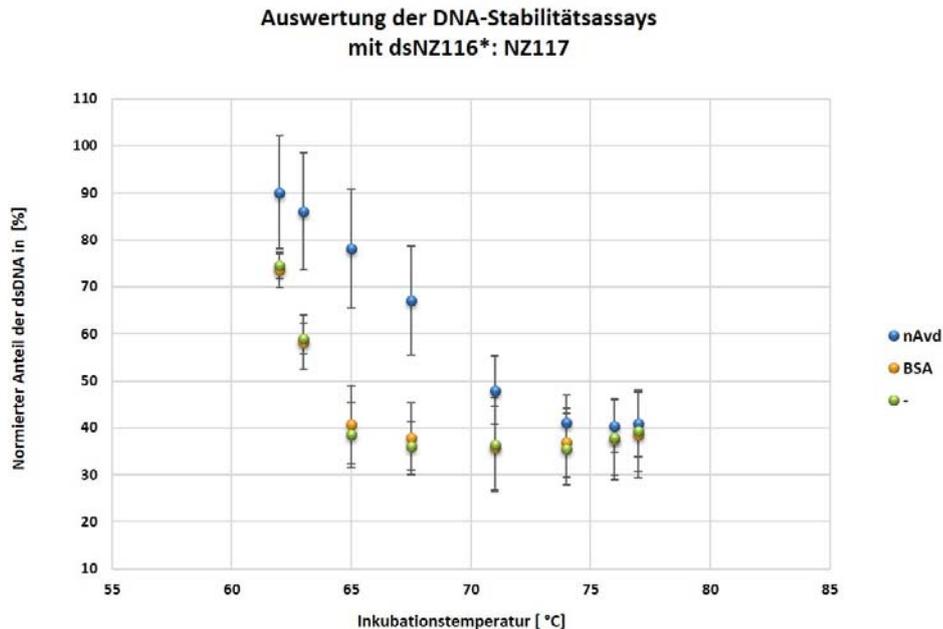
Einige Nukleinsäurechaperone sind in der Lage die Schmelztemperatur von doppelsträngigen Nukleinsäuren zu erhöhen. Daher wurde in einem weiteren Versuchsaufbau analysiert, ob die nAvd nicht nur selbst hitzestabil ist sondern zusätzlich die Schmelztemperatur von dsDNA beeinflussen kann. Hierzu wurde pre-hybridisierte dsDNA (1,6 nM) zusammen mit 1,3  $\mu$ M nAvd oder vergleichsweise mit BSA bzw. ohne Protein (-) für je 5 Minuten bei verschiedenen Temperaturen von 0 °C und 30 °C- 95 °C in 5 °C Schritten inkubiert. Aus diesen Vorversuchen konnte eine definierte Temperaturspanne ermittelt werden, bei welcher der getestete Doppelstrang (NZ116\*:117) zunehmend einzelsträngig aufgefunden werden kann. Diese Spanne zwischen 62 °C und 77 °C wurde anschließend in engeren Temperaturabständen erneut analysiert. Ein beispielhaftes Ergebnis eines solchen DNA-Stabilitätsassays ist in Abbildung 31 dargestellt. Das farbige Dreieck verdeutlicht den Temperaturanstieg, dem die Proben ausgesetzt wurden. Die Pfeile markieren die Probe, bei welcher Doppelstranganteil und Einzelstranganteil annähernd gleich stark vertreten sind. Die Teilabbildung A zeigt den Versuchsverlauf bei welchem 1,3  $\mu$ M nAvd enthalten sind. Hierbei ist deutlich erkennbar, dass der dsDNA-Anteil zu Beginn (0 °C) bis zu einem Erhitzen auf 63 °C auf einem ähnlichen Niveau bleibt und der Hauptteil (ca. 70 %) als Doppelstrang vorliegt, aber auch, dass ein gewisser Anteil in allen Proben als Einzelstrang vorliegt. Ab einer Inkubation bei 65 °C nimmt der Doppelstranganteil ab, jedoch bleibt er deutlich über 50 %. Bei einer Inkubation von 67,5 °C nähern sich der Doppelstranganteil und der Einzelstranganteil weiter an, bis bei 71 °C über die Hälfte als Einzelstrang vorliegt. Bei Inkubationen zwischen 74 °C und 77 °C liegt der Hauptanteil als Einzelstrang vor (ca. 80 %). In den Teilabbildungen B und C sind die Versuchsverläufe mit BSA und ohne Protein gezeigt. Hier ist eine ähnliche Ausgangssituation wie bei den Proben mit der nAvd zu beobachten (0 °C). Jedoch nimmt bei beiden Kontrollversuchen der Doppelstranganteil schon bei einer Inkubation von 62 °C ab, bis bei 63 °C nur noch ca. die Hälfte der DNA als Doppelstrang vorliegt. Ab 65 °C ist der Hauptanteil der DNA einzelsträngig (ca. 75 %). Dieser Zustand ändert sich auch in den folgenden Proben bis 77 °C nicht weiter.



**Abbildung 31: DNA-Stabilitätsassay mit den ds-Substraten NZ116\*: NZ117.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das farbige Dreieck werden die aufsteigenden Inkubationstemperaturen während des DNA-Stabilitätsassays dargestellt: 0 °C, 62 °C, 63 °C, 65 °C, 67,5 °C, 71 °C, 74 °C, 76 °C und 77 °C. Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$ ) sowie kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Der Doppelstrang dsNZ116\*: NZ117 wurde 1,6 nM in die Ansätze gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd bzw. der Kontrollen gestartet und nach einer 5-minütigen Inkubation bei den verschiedenen Temperaturen durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Der Großteil der DNA liegt in den Proben, in welchen nAvd enthalten ist, bis ca. 67,5 °C doppelsträngig vor, während in den Kontrollen der Hauptteil der DNA bis ca. 63 °C doppelsträngig vorliegt.

Zur weiteren Analyse wurden die Bandenintensitäten von 5 unabhängigen DNA-Stabilitätsassays mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ausgewertet und die prozentualen Doppelstrang- und Einzelstranganteile errechnet. Da der Doppelstranganteil der pre-hybridisierten DNA variierte und somit ein gewisser Einzelstranganteil in allen Proben vertreten war, herrschten bei den verschiedenen Versuchen unterschiedliche Startbedingungen. Daher wurden die errechneten Doppelstrang- und Einzelstranganteile normiert, indem der 0 °C-Wert als 100 % definiert und die Werte der 62 °C- 77 °C-Proben darauf bezogen wurden. Aus diesen Werten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese Auswertung und die daraus resultierenden Daten sind in Abbildung 32 gezeigt. Die blauen Punkte kennzeichnen den Doppelstranganteil der Proben, die nAvd

enthielten, während die orangenen Punkte den Doppelstranganteil der BSA-Proben wiedergeben. Die grünen Punkte repräsentieren den Doppelstranganteil der Proben ohne Protein (-).



**Abbildung 32: Auswertung der DNA-Stabilitätsassays nach Erhitzen der Proben, in welchen dsNZ116\*/NZ117 (1,6 nM) enthalten war.** Zudem waren entweder 1,3  $\mu$ M nAvd (blaue Punkte) enthalten oder als Negativkontrolle 2  $\mu$ M BSA (orangene Punkte) bzw. kein Protein (-, grüne Punkte). Die Ansätze wurden je 5 Minuten bei 0 °C oder 62 °C- 77 °C inkubiert. Für die Auswertung wurden von 5 unabhängigen Assays die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) mittels Phosphorimaging und Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm Image Quant TL (GE Healthcare) ermittelt und der prozentuale Anteil der Banden (ss, ds) errechnet. Anschließend wurden die Werte in Abhängigkeit des 0 °C-Wertes normiert und die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen bei den einzelnen Inkubationstemperaturen der Ansätze ermittelt. Bei der Versuchsreihe in welcher die nAvd enthalten ist, kann ein deutlicher Abfall des Doppelstranganteils ab 67,5 °C Inkubationstemperatur erkannt werden. Bei Ansätzen mit BSA oder ohne Protein (-) ist dieser Abfall ab 62 °C erkennbar. Der Punkt, an dem 50 % der DNA doppelsträngig vorliegen liegt bei der nAvd bei ca. 70 °C, während er mit BSA und ohne Protein (-) bei ca. 64 °C liegt.

Der DNA-Doppelstranganteil in den nAvd-Proben nimmt langsam ab, bis er bei 67,5 °C einen Prozentsatz von 67 % erreicht. Daraufhin erfolgt eine deutlichere Abnahme auf 48 % bei 71 °C. In den folgenden Proben, 74 °C, 76 °C und 77 °C, ist ein stabiler Doppelstranganteil von 40 %- 41 % erkennbar. Der Versuchsverlauf der beiden Kontrollen untereinander verhält sich sehr ähnlich. Bei 63 °C sind noch ca. 58 % (BSA) bzw. 59 %(-) Doppelstrang in den Proben vorhanden. Dieser Anteil nimmt bei einer Inkubation von 65 °C weiter auf ca. 40,5 % bzw. 38,5 % ab und verbleibt während den folgenden Inkubationen zwischen 35,5 %- 39 %. Somit ist die nAvd in der Lage die Denaturierung des Doppelstrangs NZ116 und NZ117 zu verzögern.

Die errechneten Standardabweichungen liegen generell zwischen 2,5 % und 9,2 %, jedoch sind auch Werte bis zu maximal 12,6 % bei den Proben der nAvd bei 62 °C- 67,5 °C aufzufinden. Hier nimmt der Doppelstranganteil verglichen mit dem Doppelstranganteil der 0 °C-Probe zwar generell ab, bei einem Versuch wurde aber auch eine leichte Erhöhungen des Doppelstranganteils bei 62 °C und 63 °C gemessen, was eine Hybridisierungsaktivität der nAvd bei diesen Temperaturen nahelegt.

### **3.2.7 Zusammenfassung der analysierten Eigenschaften der nAvd**

Die Überexpression, die Aufreinigung mittels Nickel-NTA, sowie die Dialyse und Lagerung der nAvd erzielten eine große Ausbeute mit hoher Reinheit, sodass anschließende biochemische Analysen durchgeführt werden konnten. In Bindungsstudien wurde nachgewiesen, dass die nAvd verschiedene Nukleinsäuresubstrate binden kann. Hierbei ist ein Unterschied des Bindungsverhaltens bei verschiedenen Substraten erkennbar, wobei das RNA/DNA-Hybrid aus dem DGR-System aus *Nostoc sp.* PCC 7120 am besten gebunden wurde. Die Kreuzstruktur sowie die Haarnadelstruktur aus dem DGR-System aus *Nostoc sp.* PCC 7120 wiesen ein ähnliches Bindungsverhalten auf, während das kontextfremde dsDNA-Substrat am wenigsten gut gebunden wurde.

Zudem ist die nAvd befähigt die Hybridisierung von Nukleinsäuren zu katalysieren. Hierbei wurde bei dem Substrat mit einem GC-Gehalt von 33 % und einer Länge von 48 bp (NZ116 und NZ117) das Hybridisierungsmaximum der nAvd erreicht. Abweichungen davon, wie erhöhter GC-Gehalt und zu kurze oder zu lange und Substrate mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur, wirken sich hingegen negativ auf die Hybridisierungsaktivität der nAvd aus. Die Fähigkeit einen Strangaustausch katalysieren zu können, konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine hohe Hitzestabilität der nAvd beobachtet werden. Nicht nur die nAvd selbst ist hitzestabil, darüber hinaus ist sie in der Lage die Schmelztemperatur von dsDNA zu erhöhen.

## 4. Diskussion

Diversitätsgenerierende Retroelemente stellen eine außergewöhnliche und neuartige Klasse innerhalb der Retroelemente dar, denn sie sind als einzige bekannte Elemente der mobilen genetischen Elemente in der Lage ihrem Wirt einen gezielten Selektionsvorteil zu verschaffen. Dies geschieht durch die Hypermutation eines definierten Proteins, wodurch eine hohe Anpassungsrate des Proteins an wechselnde Umwelteinflüsse möglich ist. Im Jahre 2002 wurden DGRs im *Bordetella*-Phagen entdeckt, jedoch verblieb die Forschung bis dato kennntnisarm. Zwar wurden von Medhekar und Miller potentielle Mechanismen für die Retrotransposition von DGRs postuliert, jedoch stellen diese Arbeitshypothesen dar (Medhekar und Miller, 2007), die es zu prüfen gilt. Außerdem konnte noch nicht geklärt werden, ob es sich bei DGRs um eine Einzelercheinung handelt und diese nur im *Bordetella*-Phagen aktiv sind. In der Zwischenzeit konnten zwar viele weitere Elemente in verschiedenen Prokaryoten und Archaeen entdeckt werden, jedoch ist nicht klar, ob die Funktionsweisen und Erkenntnisse allgemein gültig sind und auf andere Elemente angewendet werden können. Ein erster wichtiger Schritt in Richtung generelle Aussage zur Funktionsweise von DGRs ist die funktionelle Analyse weiterer DGR-Systeme. Daher wurden in dieser Arbeit Komponenten des DGR-Systems aus *Nostoc sp.* PCC 7120 analysiert. Denn neben der Allgemeingültigkeit der Funktionsweise stellt sich die Frage nach weiteren Wirkungsmechanismen und biologischen Funktionen von DGRs. Zudem ist ein weiterer Machbarkeitsnachweis einer DGR-RT-Aktivität für das Verständnis des Mechanismus von großem Nutzen und auch die Mutationsfähigkeit der RT gilt es noch zu erforschen. Darüber hinaus konnte zwar die Bedeutung des akzessorischen Proteins aus dem DGR des *Bordetella*-Phagen für einen effektiven *Homing*-Prozess dargelegt werden, jedoch ist über seine Funktion nur sehr wenig bekannt. Daher wurden diese beiden essentiellen Komponenten aus dem DGR-System von *Nostoc sp.* PCC 7120 in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dieses hochaktuelle Forschungsgebiet verfügt über wissenschaftliche und medizinische Relevanz. Denn die gezielte Manipulation eines Zielgenes ist für die klinische Anwendung von größtem Interesse, und somit bieten DGR-Systeme ein großes Potential für unzählige Einsatzmöglichkeiten in der Gentherapie. Neben der gezielten Manipulation besitzen DGR-Systeme ein bemerkenswert hohes Diversifizierungspotential. Dabei ist beispielsweise bekannt, dass einige DGRs ein größeres Diversifizierungspotential haben als Immunglobuline der Immunantwort von Säugetieren (Arambula et al., 2013). Vergleicht man das Immunsystem mit dem DGR-System ist auffällig, dass bei beiden Systemen das große Diversifizierungspotential mit Hilfe spezieller Proteinfaltung gewährleistet wird. Hierbei bedienen sich Antikörper und T-Zellrezeptoren der Ig-Faltung, während das Zielgen eines DGRs sich die CLec-Faltung zu Nutze macht (Arambula et al., 2013).

Durch das hohe Diversifizierungspotential und die außerordentliche Spezifität von DGRs könnten sie als ein neues Werkzeug des *Genome Editing* etabliert werden. Zwar bedarf es dazu noch eines besseren Verständnisses und weiterführender Grundlagenforschung, jedoch haben Verfahren, wie Zinkfingernukleasen (ZFN) und transkriptionsaktivatorartige Effektor nuklease (TALEN) ebenfalls eine große Bedeutung im *Genome Editing* bekommen (Boch, 2011; Boch et al., 2009; Carroll, 2011; Porteus und Carroll, 2005). Vor allem aber das CRISPR/Cas-System hat es von der Grundlagenforschung in die therapeutische Anwendung geschafft und sich zu einer der wichtigsten Methoden der gezielten Genmodifikation entwickelt (Wang et al., 2014). CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Elemente) sind kurze sich wiederholende Sequenzen, welche von verschiedenen Sequenzen, *Spacer*, unterbrochen sind. Bei den *Spacern* handelt es sich um Fremd-DNA von Viren, die von dem Wirt integriert wurden. Durch diese Adaption erwirbt der Wirt eine Immunität gegenüber dem eindringenden Organismus (Brouns et al., 2008). Mit den dazugehörigen CRISPR-assoziierten Genen (*cas*-Gene) stellt das CRISPR/Cas-System einen wichtigen Bestandteil der Immunabwehr vieler Prokaryoten und der meisten Archaeen dar (Carte et al., 2008; Marraffini und Sontheimer, 2011; Vestergaard et al., 2014). Dieser Mechanismus bietet unzählige Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die künstliche Immunisierung von Bakterien gegen diverse Phagen, indem passende *Spacer* in die CRISPR-Sequenz der Bakterien integriert werden. Dies kann in vielen industriellen Abläufen Anwendung finden. Darüber hinaus bietet das CRISPR/Cas-System eine Vielzahl therapeutischer Anwendbarkeit, vor allem weil das CRISPR/Cas-System in allen bis dato getesteten Organismen wie Hefe, Zebrafisch, *Drosophila*, *C. elegans*, *Arabidopsis*, Tabakpflanze, Sorghumhirsen, Reis oder dem menschlichen Genom, funktionsfähig ist (Dicarlo et al., 2013; Friedland et al., 2013; Gratz et al., 2013; Guo und Li, 2015; Hwang et al., 2013; Jiang et al., 2013; Wang et al., 2014; Yang et al., 2013). Das CRISPR/Cas-System weist Ähnlichkeiten zum System der RNA-Interferenz (RNAi) auf, welches für die Virusabwehr in Eukaryoten verantwortlich ist (Carte et al., 2008; Ding und Voinnet, 2007), auch wenn das System der RNAi deutlich komplexer ist. CRISPR sind mobile Elemente (Jansen et al., 2002), deren Sequenzen hoch konserviert, zwischen verschiedenen Spezies jedoch unterschiedlich sind (van Embden et al., 2000). Diese Eigenschaften lassen sich analog auch im DGR-System wieder finden, was auf eine vergleichbare Anwendbarkeit hoffen lässt. Auch für die Grundlagenforschung ist der einzigartige DGR-Mechanismus sehr lehrreich und sollte daher unbedingt entschlüsselt werden.

## 4.1 Die reverse Transkriptase Alr3497 aus *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR

Die reverse Transkriptase, also die RNA-abhängige DNA-Polymerase, ist das Hauptmerkmal für alle Retrotransposons. Hierbei unterscheiden sich die RTs von DGRs in drei essentiellen Punkten von bisher beschriebenen RTs, wie beispielsweise der HIV RT. DGR-RTs besitzen keine RNase H Domäne, sind mit durchschnittlich 378 aa vergleichsweise kurz und besitzen in der Domäne 4 ein klassenspezifische Serin-Glutamin-Motiv (SQ-Motiv) (Schillinger et al., 2012; Simon und Zimmerly, 2008). Es wird angenommen, dass die DGR-RT die spezifischen Adenin-Substitutionen während der cDNA-Synthese generiert. Zwar ist keine Gruppe von RTs bekannt, die hochspezifische basenabhängige Mutationen generieren kann, möglicherweise ist aber das DGR-spezifische SQ-Motiv innerhalb der vierten Domäne der DGR-RTs dafür mitverantwortlich. Dieses ist charakteristisch für DGR-RTs, da RTs aus verwandten Elementen ein Serin-Prolin-Motiv (SP-Motiv) an dieser Position aufweisen (Schillinger, 2013; Schillinger et al., 2012). Der Prolinrest der HIV-RT ist unter anderem an der cDNA-Synthese beteiligt. Das DGR-charakteristische SQ-Motiv, bei welchem der Prolinrest gegen Glutamin ausgetauscht ist, könnte also essentiell für die spezifischen Adenin-Substitutionen sein (Schillinger, 2013). Ein experimenteller Nachweis über die Fähigkeit einer DGR-RT Adenin spezifische Mutationen während der reversen Transkription zu generieren bleibt jedoch bis dato noch aus, jedoch sind bei der Entstehung der TR RNA Zwischenstufe noch keine Mutationen erkennbar (Guo et al., 2008). Erst nach der cDNA-Synthese durch die DGR-RT können die hochspezifischen Mutationen nachgewiesen werden. Auch die hohe Fehlerrate von RTs im Allgemeinen unterstützt diese Theorie.

### 4.1.1 Die RT aus *Nostoc sp.* PCC 7120 erweist sich als höchst sensibel

Das Arbeiten mit RTs erweist sich generell als sehr schwierig. Diesem Sachverhalt ist es geschuldet, dass bis zum heutigen Zeitpunkt gerade einmal von drei unterschiedlichen RTs die Strukturanalysen aufgeklärt wurde, unter anderem von den RTs aus dem M-MLV (Das und Georgiadis, 2004) und aus dem HI-Virus (Jacobso-Molina et al., 1993; Kohlstaedt et al., 1992). In beiden Fällen konnte dies nur mit Hilfe von Mutationen und Deletionen, zur Verbesserung der Löslichkeit und Stabilität, erreicht werden. Auch die Expression und Aufreinigung der nRT in den hier durchgeführten Versuchen erwies sich als schwierig. Für Strukturanalysen ist es jedoch notwendig, dass das zu untersuchende Protein in hoher Ausbeute aufgereinigt und stabil vorliegt. Zwar wurden diverse Parameter während der Expression, wie die kompetenten *E. coli* Zellen, Temperatur und Dauer, die Konzentration des Inducers, oder auch die Medien variiert, jedoch war die Ausbeute an löslichem Protein unter allen Versuchsbedingungen nur gering. Möglicherweise könnte die Löslichkeit der nRT durch die Fusion an das *Maltose Binding Protein* (MBP) aus *E. coli* erhöht werden, da das MBP Aggregationen verhindern und sogar die Faltung des fusionierten Proteins in die biologisch aktive Konformation unterstützen kann (Dale et al., 1994;

Fox et al., 2003; Kapust und Waugh, 1999). Darüber hinaus könnte die an das MBP fusionierte nRT über Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt und der MBP-Tag im Anschluss bei Bedarf mittels Protease wieder entfernt werden. Ferner kann das MBP bei Strukturanalysen von schwierigen Proteinen unterstützend wirken (Waugh, 2016).

#### **4.1.1.1 Die Aufreinigung der nRT erfordert weitere Optimierungen**

Neben verschiedenen Expressionsparametern wurden ebenfalls diverse Aufreinigungsmethoden sowie verschiedene Pufferzusammensetzungen getestet. Die bRT konnte mittels Nickel-Affinitätschromatographie erfolgreich aufgereinigt werden (Alayyoubi et al., 2013). Daher wurde diese Methode auch zur Aufreinigung der nRT herangezogen. Hierbei scheint der 6x His-Tag für die Nickelmatrix unzugänglich gelegen zu sein und somit nicht interagieren konnte, da nur ein geringer Teil der nRT an die Nickelsäule gebunden werden konnte. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob der Tag C- oder N-terminal an das Protein fusioniert war. Möglicherweise sind im nativen Zustand des Proteins dessen Termini so gefaltet, dass sie für die Nickelnitriolotriessigsäure erschwert bzw. gar nicht zugänglich sind. Durch die geringe Bindung der nRT an die Nickelsäule wurde stattdessen vermehrt die unspezifische Bindung von endogenen *E. coli* Proteinen beobachtet. Diese unspezifischen Bindungen konnten durch eine geringe Zugabe von Imidazol in den Lysepuffer reduziert werden. Dadurch konnte die Bindungsaffinität der nRT verbessert werden, ähnlich wie es auch für die Proteinkinase G mit 6x His-Tag aus *Mycobacterium bovis* beschrieben wurde (Hölscher et al., 2006). Ebenfalls wurde die Aufreinigung der nRT über Heparin-Affinitätschromatographie getestet, da sich diese Aufreinigungsmethode bei reversen Transkriptasen, wie beispielweise der RT aus dem M-MLV (Kotewicz et al., 1988), als geeignet erwiesen hat. Zwar konnte auch hier ein Teil der nRT an die Heparinmatrix gebunden und auch eluiert werden, jedoch war dies ebenfalls bei endogenen *E. coli* Proteinen der Fall. Darüber hinaus war es nicht möglich die nRT vollständig von der Heparinmatrix zu eluieren. Diese Beobachtung deckt sich mit einer vorherigen Studie, in welcher Heparin als Komplexbilder für RTs beschrieben wurde (Gopalakrishnan et al., 1992). Da sich nach einigen Optimierungsversuchen keine Verbesserungen zeigten, wurde von weiteren Aufreinigungen mittels Heparin abgesehen.

Die RT aus dem DGR-System des *Bordetella*-Phagen konnte unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und mittels Rückfaltung aus Einschlusskörperchen renaturiert werden (Liu et al., 2002). Daher wurde die Expression und Aufreinigung der nRT ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen getestet. Hierbei konnte ein kleiner Anteil der nRT sauber aufgereinigt werden. Bei der anschließenden Rückfaltung in den nativen Zustand fielen die Proteine jedoch aus, sodass diese nicht weiter analysiert

werden konnten. Dies unterstreicht erneut die Komplexität und die Empfindlichkeit von reversen Transkriptasen. Generell wiesen die nRTs, welche aufgereinigt werden konnten keine Aktivität auf. Eventuell binden vor allem falsch gefaltete RTs, die somit nicht aktiv sind, an die Matrizen. Möglicherweise benötigt die nRT auch Cofaktoren aus *E. coli*, die nach der Aufreinigung nicht mehr vorhanden sind. Die Reinheit der nRT könnte möglicherweise durch mehrere aneinander gereihte Aufreinigungsmethoden erhöht werden, wie schon für eine synthetische RT aus HeLa-Zellen beschrieben wurde (Fridlender et al., 1972), jedoch würde dies mit einem Verlust der Ausbeute einhergehen. Für weiterführende Optimierungen könnte beispielsweise die Aufreinigung mittels Ionenaustauscher wie Mono S, Diethylaminoethylcellulose (DEAE) oder Phosphocellulose ausgetestet werden. Ebenfalls könnte Polymin P, welches zur Aufreinigung von Nukleinsäure-bindenden Proteinen genutzt wird, verwendet werden, denn mit diesen hier aufgeführten Substanzen konnten schon RTs erfolgreich aufgereinigt werden (Fridlender et al., 1972; Kotewicz et al., 1988; Roth et al., 1985).

#### ***4.1.1.2 Die Stabilität der nRT erweist sich weiterhin als problematisch***

Eine gewisse Stabilität des Proteins ist nicht nur für die Reproduzierbarkeit von anschließenden Charakterisierungen, sondern auch für Strukturanalysen essentiell. Da die nRT nur sehr instabil vorlag, wurden diverse Lagerpuffer getestet, wobei die Glycerolkonzentration immer bei 50% lag, da sich diese auf Proteine stabilisierend auswirkt (Vagenende et al., 2009). Es wurden verschiedene Puffersubstanzen, Salze und Zusammensetzungen ausgetestet (Tabelle 18, Anhang). Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine optimalen Pufferbedingungen für die nRT geschaffen werden. Die Problematik der Instabilität war offenbar auch bei der Analyse der bRT gegeben, denn diese wurde ebenfalls regelmäßig neu exprimiert (Alayyoubi et al., 2013; Liu et al., 2002). Auch die Expression und Aufreinigung der bRT aus Einschlusskörperchen (Liu et al., 2002), resultierten nicht in einer funktionelle bRT, mit welcher biochemische Analysen durchgeführt werden konnten. Grund dafür ist vermutlich ebenfalls die mangelnde Stabilität der bRT. Allerdings wurde eine Mutante, welche an Position 138 ein Glutamin an Stelle eines Aspartatrestes aufweist, entdeckt, die eine erhöhte Stabilität gegenüber der Wildtypvariante verfügt (Alayyoubi et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde eine analoge nRT Mutante mittels ortsspezifischer Mutagenese hergestellt. Hierbei wurde das Aspartat an Position 135 ebenfalls durch ein Glutamin ersetzt. Dieses Aspartat ist homolog zu dem D110 der HIV-RT, welches eines der drei katalytischen Aspartate darstellt (Esposito et al., 2012; Sarafianos et al., 2010). Auch das D138 der bRT scheint deren katalytische Aktivität zu beeinflussen, denn die D138Q-Mutante weist gerade einmal ein Fünftel der Wildtypenzymaktivität auf (Alayyoubi et al., 2013).

Die Wildtyp-nRT lag in früheren Studien (Morgenstern, 2014; Schillinger, 2013, sowie unveröffentlichte Daten Dipl. Biol. Maike Gieseke, Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern) extrem instabil vor, sodass Aktivitätsstudien nicht möglich waren. Daher wurde die Wildtyp-nRT in der vorliegenden Arbeit zwar weiter untersucht, jedoch wurde vor allem die nRT- Mutante D135Q verwendet und die beschriebenen Versuche wurden primär mit dieser Mutante durchgeführt (3.1.4.1). Jedoch erzeugte auch diese Mutation nicht die gewünschte Stabilität, weshalb für künftige Studien zunächst ein *Screening* nach löslicheren und stabileren Varianten mittels ortsspezifischer Mutagenese sinnvoll wäre. Zudem sind weitere Optimierungen der nRT für zukünftige Analysen unabdingbar, denn nur so kann die Reproduzierbarkeit der Versuche und eine damit verbundene aussagekräftige Auswertung gewährleistet werden. So könnten, ähnlich wie bei der Analyse der M-MLV und der HIV RT, durch Mutationen optimierte Varianten der nRT hergestellt werden, welche dann detaillierte Untersuchungen ermöglichen. Beispielsweise könnten auch hier ungeordnete Bereiche, sobald diese identifiziert wurden, deletiert werden.

#### **4.1.2 Erste Hinweise auf eine RT-Aktivität aus dem *Nostoc sp* PCC 7120 DGR**

Die Expression, die Aufreinigung und die Ausbeute an löslichem Protein, sowie die Stabilität der nRT stellen sich als äußerst sensibel dar, sodass für jede biochemische Charakterisierung eine neue Präparation der nRT nötig war. Zudem wurde in den hier dargestellten Versuchen das Rohextrakt der Überexpressionen verwendet. Die damit verbundene niedrige Reproduzierbarkeit erschwerte die aussagekräftige Auswertung derart, dass von einer Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen abgesehen wurde. Dennoch war es möglich, Hinweise auf eine RT-Aktivität aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR zu beobachten. Hierbei ist zu erwähnen, dass eine Aktivität nur von der nRT-Mutante D135 und nicht der Wildtyp-nRT gemessen werden konnte (3.1.4.1). Nicht nur Strukturanalysen sondern auch Aktivitätsstudien von reversen Transkriptasen sind, verglichen mit anderen Enzymen, kaum vorhanden. Daher stellt dieser Machbarkeitsnachweis einen großen Fortschritt in der Analyse des DGR-Mechanismus dar. Abgesehen von der bRT konnte bis dato von keiner anderen DGR-RT eine Aktivität nachgewiesen werden, sodass mit den hier gewonnen Ergebnissen ein Schritt in Richtung einer allgemeingültigen Aussage gegenüber DGR-RTs getan werden kann. Weiterhin konnte mittels DNase-Verdau nachgewiesen werden, dass es sich bei den während der RT-Reaktion entstandenen Nukleinsäuren tatsächlich um DNA handelt (Abbildung 14). Zudem konnte mittels PCR die während des RT-Assays synthetisierte DNA amplifiziert und analysiert werden. Hierbei konnten jedoch keine A-Substitutionen oder andere Mutationen beobachtet werden. Somit zeigt die RT aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR keine Mutationsrate auf. Möglicherweise ist die RT doch

nicht selbst oder alleine das Element, welches für die A-spezifische Hypermutation verantwortlich ist. Dies würde daraufhin deuten, dass der DGR-Mechanismus noch viel komplexer ist und mehr Komponenten darin involviert sind als zunächst angenommen. Es wäre auch denkbar, dass die RT bestimmte Cofaktoren für eine effiziente Mutagenese benötigt. Neben Magnesium, welches hier in den Reaktionen vorhanden war, spielen oft Metallionen wie Mangan oder Zink für Polymerasen eine wichtige Rolle. Beispielsweise bevorzugt die RT des AIDS-assoziierten Retrovirus bei einem AT-reichen Matrizen Magnesiumionen, während sie bei einer GC-reichen Matrize Manganionen bevorzugt (Hoffman et al., 1985). Die RT des M-MLV benötigt neben Magnesiumionen ebenfalls Manganionen zur effizienten cDNA-Synthese (Roth et al., 1985) und die RT des *Avian Myeloblastosis Virus* ist ein Zink-Metalloenzym (Auld et al., 1974). Eine ebenfalls sehr plausible Erklärung für die fehlende Hypermutation durch die nRT könnte, bedingt durch einen fehlenden Selektionsdruck bei der Lagerung in Kultur, das Verlieren ihrer Hypermutationskompetenz sein. Dies wurde ebenfalls bei der RT aus dem *Trichodesmium erythraeum* DGR beobachtet (Pfreundt et al., 2014). Außerdem wurde in den hier dargestellten Versuchen nur eine geringe Ausbeute an PCR-Produkt erzielt. Vielleicht ist die Hypermutationsrate der nRT sehr gering und lag in den analysierten Proben somit unter der Nachweisgrenze, sodass eine Optimierung des Versuchsprotokolls doch noch zu einer Detektion führen könnte. Solch eine geringe Diversifizierungsfrequenz des *Nostoc sp.* PCC 7120 DGRs wurde ebenfalls in einer früheren Untersuchung beobachtet, wobei es sich möglicherweise um eine Regulation durch den Wirt handelt. Bei diesen Untersuchungen konnten zwar DGR-vermittelte Mutationen nachgewiesen werden, jedoch wurde die RT in niedrigen Mengen transkribiert (Möller, 2015). Auch bei der Analyse der RT aus dem DGR-System aus *Anabaena flos-aquae* war eine Transkription der RT unter Normalbedingungen kaum nachweisbar, jedoch konnte die Transkriptmenge unter Kältestress (4 °C) erhöht werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Transkription der RT unter Stressbedingungen erhöht wird, um somit eine DGR-vermittelte Anpassung an sich ändernde Bedingungen zu ermöglichen (Möller, 2015). Für das DGR-System aus dem *Legionella pneumophila*-Bakterium wurde ebenfalls eine niedrige Diversifizierungsaktivität beobachtet (Arambula et al., 2013). Die Mutagenisierung konnte jedoch mittels exogener Expression der DGR-Komponenten gesteigert werden, somit scheint auch hier die Diversifizierungsfrequenz über die Transkriptmenge der DGR-Komponenten reguliert zu sein. Solch eine Regulierung der RT-Transkripte würde das Risiko funktionslose Proteine zu generieren reduzieren.

Die entstehende genetische Vielfalt von DGRs ist mit einem Nutzen für den Wirt verbunden. Wie die Adenin-Mutationen genau entstehen konnte auch in dieser Studien nicht geklärt werden, sodass der experimentelle Nachweis, die RT sei für diese hochspezifischen Mutationen verantwortlich, noch immer aussteht. Beide getesteten Template, eine kontextfremde sowie eine elementeigene Sequenz,

wurden von der nRT in vergleichbarem Maße translatiert, was auf eine Matrizenunabhängigkeit der nRT hindeutet.

Die immer wieder zu detektierten Signale und Banden, ausgelöst durch die Proben der endogenen *E. coli* Proteine, sind möglicherweise durch *E. coli* eigene Polymerasen erklärbar. Beispielsweise kann die *E. coli* Polymerase I auch als reverse Transkriptase fungieren und darüber hinaus kodiert *E. coli* eigene RTs, wie die aus dem Retron Element (Lampson et al., 1990; Ricchetti und Buc, 1993). Somit muss von einer gewissen Grundaktivität durch die endogenen *E. coli* Proteine ausgegangen werden, welche Einfluss auf die Versuche haben können. Auch die niedrige Reproduzierbarkeit stellte ein großes Problem dar, sodass Auswertungen und weitreichende Analysen sich als schwierig erwiesen. Jedoch konnten von zwei Personen parallel durchgeführte Versuche zeigen, dass es sich bei der niedrigen Reproduzierbarkeit nicht um technische Probleme, sondern um andere Faktoren, wie Proteinpräparation oder Templat handelt.

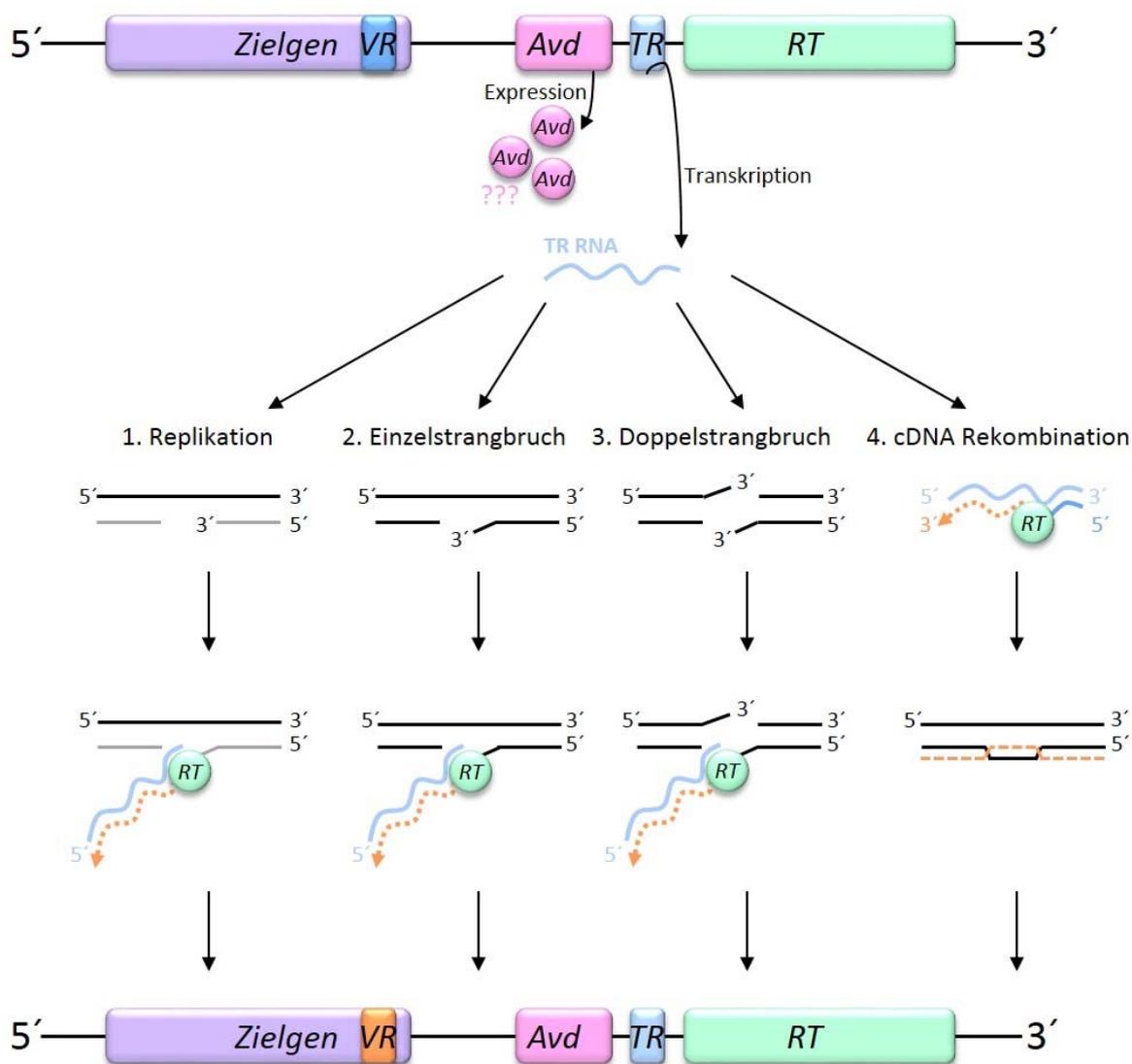
## **4.2 Das akzessorische Protein Alr3496 aus *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR**

Das akzessorische Protein, Avd (*accessory variability determinant*) genannt, kann in einer Vielzahl von DGRs aufgefunden werden und ist zwischen VR und TR lokalisiert. Seitdem nachgewiesen wurde, dass die Avd eine wichtige Rolle im *Homing* Prozess spielt (Doulatov et al., 2004; Medhekar und Miller, 2007), wurde versucht die Funktion der Avd zu entschlüsseln. Zwar konnte eine Sequenzähnlichkeit zu S23 ribosomalen und S23 ribosomal-ähnlichen Proteinen (Pronk und Sanderson, 2001; Ralph und McClelland, 1993) gezeigt werden, jedoch sind deren Funktionen ebenso unbekannt. Die Gruppe um Alayyoubi (Alayyoubi et al., 2013) konnte erste unspezifische Bindungen von Nukleinsäuren durch die Avd aus dem *Bordetella*-Phagen DGR, bAvd, nachweisen. Diese Ergebnisse konnten von Schillinger bei der Analyse der Avd aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR, nAvd, untermauert werden und darüber hinaus gab die Arbeit erste Hinweise auf eine Funktion als Nukleinsäurechaperon. Eine Helikase- oder ATPase-Funktion konnte Schillinger hingegen nicht beobachtet werden (Schillinger, 2013). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit detaillierte Analysen zur Charakterisierung der nAvd Funktion durchgeführt.

### **4.2.1 Potentielle Mechanismen für die Retrotransposition von DGRs**

Zur Einordnung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und somit der Rolle der nAvd, ist es notwendig die potentiellen Mechanismen des *Mutagenic Homing* Prozesses zu verstehen. Einerseits ist ein

Mechanismus ähnlich dem der *Target primed reverse Transcription* (TPRT), bei welchem die reverse Transkription und der *Homing* Prozess in einem Schritt stattfinden vorstellbar. Andererseits wäre ein Mechanismus möglich, bei welchem die RT und das *Mutagenic Homing* getrennt voneinander ablaufen, wobei ein solcher Mechanismus RecA unabhängig ist (Gou 2008). Die von der Arbeitsgruppe um Jeff F. Miller postulieren potentiellen Mechanismen sind in Abbildung 33 schematisch dargestellt (Medhekar und Miller, 2007).



**Abbildung 33: Vier potentielle Mechanismen für die Retrotransposition von DGRs nach Medhekar und Miller, 2007.** 1. Replikation: Okazaki-Fragment (grau) dient als Primer zum Start der reversen Transkription der TR RNA. 2. Die durch einen Einzelstrangbruch im Antisense-Strang entstandene 3'-Hydroxylgruppe dient als Primer für die nachfolgende reverse Transkription. 3. Die durch einen Doppelstrangbruch entstandene 3'-Hydroxylgruppe im Antisense-Strang dient als Primer für die nachfolgende reverse Transkription. 4. RecA-unabhängige homologe Rekombination der cDNA mit dem Antisense-Strang der VR, wobei der *Homing* Prozess und die reverse Transkription getrennt voneinander ablaufen. Die Abbildung wurde von Medhekar und Miller 2007 adaptiert.

Die ersten drei der vier dargestellten Mechanismen legen einen TPRT-ähnlichen Mechanismus zu Grunde. Im ersten Mechanismus (Abbildung 33) wird davon ausgegangen, dass die Retrotransposition während der Replikation abläuft. Hierbei dient das Okazaki-Fragment als initialer Primer für die reverse Transkription. Der generierte Antisense-Strang wird nun mit Hilfe unbekannter Faktoren mit dem *downstream* liegenden Teil der VR ligiert und der Sense-Strang anschließend durch eine komplementäre Sequenz ausgetauscht. Ein ähnlicher Mechanismus während der Replikation konnte ebenfalls für das Gruppe II-Intron RmtInt1 aus *Sinorhizobium meliloti* beobachtet werden (Martínez-Abarca et al., 2004). Der zweite und dritte Mechanismus gehen von einem Einzelstrangbruch im Antisense-Strang bzw. Doppelstrangbruch innerhalb des (G/C)<sub>14</sub> Elements aus (Cost et al., 2002; Guo et al., 2008; Luan et al., 1993; Zimmerly et al., 1995). Die hierbei entstandene 3'-Hydroxylgruppe dient als Primer für die nachfolgende reverse Transkription (Guo et al., 2011), welcher wiederum direkt die Integration folgt. Bei diesen beiden Mechanismen wird der Einzelstrang- bzw. Doppelstrangbruch durch einen noch unbekanntem Faktor wie beispielsweise eine Endonuklease verursacht, wobei sowohl ein Protein als auch eine katalytische RNA denkbar sind (Guo et al., 2008). Der vierte Mechanismus legt eine RecA unabhängige homologe Rekombination der cDNA zu Grunde, bei welcher reverse Transkription und Integration getrennt voneinander ablaufen, wie es für das Hefe-Retrotransposon Ty5 gezeigt wurde (Storici et al., 2007). Mittels homologer Rekombination wird die neu synthetisierte cDNA in den Antisense-Strang der VR-Region integriert, wobei der für die reverse Transkription benötigte Primer noch nicht bekannt ist; der Sense-Strang wird im Anschluss mittels zelleigener Reparaturmechanismen generiert (Storici et al., 2007).

Die Mechanismen 2 und 3 werden momentan als die Wahrscheinlichsten angesehen, auch wenn hierbei noch einige Faktoren und Abläufe unbekannt sind (Guo et al., 2008). Ein solcher TPRT-ähnlicher Mechanismus wird ebenfalls von Non-LTR Retrotransposons und Gruppe II Introns zur Retrotransposition genutzt (Kazazian, 2004; Luan et al., 1993; Repanas et al., 2007). Da die RTs von Gruppe II Introns und DGRs evolutionär höchste Verwandtschaft aufweisen, ist dies ebenfalls für DGRs denkbar (Doulatov et al., 2004; Lambowitz und Zimmerly, 2004; Liu et al., 2002; Minot et al., 2012). In jedem der dargestellten Mechanismen wäre ein bedeutsames Mitwirken der nAvd durchaus vorstellbar. Im Folgenden werden die hier gewonnenen Ergebnisse eingeordnet.

#### **4.2.2 Die nAvd bindet verschiedene Nukleinsäuren mit unterschiedlicher Affinität**

In bisherigen Analysen konnten zwar eine Bindung der Avd an Nukleinsäuren, jedoch keine Sequenzspezifität (Alayyoubi et al., 2013; Pakebusch, 2014; Schillinger, 2013) oder Präferenz zwischen Nukleinsäuren beobachtet werden (Alayyoubi et al., 2013). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit

weiterführende Bindungsstudien durchgeführt, wobei Nukleinsäurepräferenzen beobachtet werden konnten. Generell werden die in dieser Versuchsreihe getesteten RNA/DNA-Hybride im Vergleich zu doppelsträngigen DNA-Substraten besser gebunden, gefolgt von ssRNA-Substraten (Tabelle 17). Fasst man diese Ergebnisse mit denen aus den vorherigen Studien (Pakebusch, 2014; Schillinger, 2013, Tabelle 20) zusammen können folgende Affinitäten der nAvd festgestellt werden:

ssDNA werden mit einem Kd-Wert von 40  $\mu$ M- 50  $\mu$ M am effizientesten gebunden, gefolgt von RNA/DNA-Hybride (<80  $\mu$ M- 200  $\mu$ M) und doppelsträngiger DNA (80  $\mu$ M- 400  $\mu$ M), wobei eine effizientere Bindung der Haarnadel- bzw. Kreuzstruktur (80  $\mu$ M- 200  $\mu$ M) verglichen mit der kontextfremden dsDNA (<200  $\mu$ M- 400  $\mu$ M) beobachtet werden kann. Dies untermauert die Hypothese, dass die Haarnadelstruktur wegen ihrer weiten Verbreitung und der starken Konservierung der Sequenzen eine entscheidende Funktion haben könnte. Denkbar ist beispielsweise eine Funktion als Erkennungselement oder ein direkter Kontakt mit anderen wichtigen DGR-Komponenten, wie der RT oder Avd (Guo et al., 2011). Doppelsträngige DNA wird wiederum mit einer höheren Affinität als einzelsträngige RNA (300  $\mu$ M- 400  $\mu$ M) gebunden. Die getesteten einzelsträngigen RNA-Moleküle sind deutlich länger und mit drei Haarnadelstrukturen strukturell komplexer als die restlichen getesteten Substrate, wodurch die Bindung zusätzlich erschwert wird; vor allem die einzelsträngigen DNA-Substrate sind deutlich kürzer und strukturell weniger komplex.

Die hier beschriebene Reihenfolge der Affinität könnte die potentiellen Schritte des *Homing* Prozesses widerspiegeln. Die nAvd zeigt die niedrigste Affinität zur TR ssRNA, sodass diese möglicherweise präferiert von der RT gebunden werden kann, um die reverse Transkription zu starten. Die hier nachgewiesene Bindung könnte beispielsweise dazu dienen die TR-RNA zur VR zu lotsen. Die Theorie über eine Funktion der nAvd als Lotse könnte ebenfalls von der hohen Affinität gegenüber ssDNA, wie beispielsweise gegenüber der VR nach einem Einzelstrang- oder Doppelstrangbruch, unterstützt werden. Bei der anschließenden Synthese der komplementären DNA durch die elementeigene RT wird der entstandene RNA/DNA-Hybrid (hier getestete TR-RNA mit DNA IHM\* Tabelle 19) mit hoher Affinität von der nAvd gebunden. Auch hier wäre eine Funktion der nAvd als Lotse denkbar, jedoch könnte dies auch auf eine stabilisierende Funktion der nAvd hinweisen. Nach bzw. während der Integration nimmt die Affinität der nAvd zur doppelsträngigen DNA, im Vergleich zu den ssDNA und RNA/DNA-Hybrid, wiederum ab. Der Prozess des *Mutagenic Homing* ist abgeschlossen und die nAvd wird nicht mehr benötigt. Somit würde die nAvd Hilfsfunktionen während eines Großteiles des gesamten *Homing* Prozesses ausführen. Die hier postulierten Wirkungsweisen und Funktionen der nAvd erfordern zweifellos weiterführende detaillierte Untersuchungen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwiefern GC-Gehalt und Substratlänge eine Bindung durch die nAvd beeinflussen,

müssen ebenso weitere Versuche durchgeführt werden. Jedoch deuten die zusammengefassten Ergebnisse darauf hin, dass diese Faktoren geringe oder keine Auswirkung auf das Bindungsverhalten ausüben, da getestete Substrate mit vergleichbarem GC-Gehalt und vergleichbarer Länge mit unterschiedlicher Affinität gebunden wurden Tabelle 20.

Zur besseren Einordnung der hier gewonnenen Dissoziationskonstanten der nAvd, werden im Folgenden die Kd-Werte anderer Nukleinsäure-bindenden Enzymen zum Vergleich herangezogen. Die DNA Polymerase  $\beta$  aus *Rattus norvegicus* binden verschiedene Nukleinsäuren mit Kd-Werten zwischen 2,7  $\mu$ M-1 mM (Dunlap und Tsai, 2002; Maitra et al., 2002) und die T7-RNA Polymerase aus dem T7 Bacteriophagen bindet Nukleinsäuren mit Kd-Werten zwischen 0,47-1,13  $\mu$ M (Bandwar et al., 2002). Die RNA Polymerase sigma-54 Faktor aus *Escherichia coli* weist mit Kd-Werten zwischen 0,4-40 nM eine sehr hohe Bindungsaffinität gegenüber verschiedener Nukleinsäuren auf (Vogel et al., 2002). Für die meisten Proteine konnten Dissoziationskonstanten im Bereich von  $e \cdot 10^{-3}$  bis  $e \cdot 10^{-10}$  auf (Prabakaran et al., 2001) gezeigt werden. Somit hat die nAvd ( $4,0 \cdot 10^{-10}$ - $3,0 \cdot 10^{-9}$ ) eine durchaus hohe Affinität zu den verschiedenen Nukleinsäuren.

#### 4.2.3 Die nAvd katalysiert die Hybridisierung von Nukleinsäuren

Zur weiteren Analyse der nAvd-Funktionen als Nukleinsäurechaperon wurden Versuche durchgeführt, welche die Hybridisierung von Nukleinsäuren durch die nAvd untersuchen. Hierzu wurden Substrate mit verschiedenen GC-Gehalten und Längen verwendet, wobei das Substrat mit mittlerer Länge (48 bp) und einem niedrigen GC-Gehalte (33%) am effizientesten von der nAvd hybridisiert wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass AT-reiche Substrate besser hybridisiert werden als GC-reiche, da ein gleichlanges GC-reiches Substrat deutlich weniger von der nAvd hybridisiert wurde. Außerdem spielt die Länge der Substrate für die Hybridisierungsrate eine entscheidende Rolle. Das 29mer Substrat weist mit 62% einen ähnlichen AT-Gehalt wie das *Nostoc sp.* PCC 7120 Genom auf, jedoch ist die Hybridisierungsrate niedriger verglichen mit dem getesteten AT-reichen 48mer-Substrat. Möglicherweise ist eine Länge von 29 bp für die Bindung und eine effiziente Hybridisierung der nAvd zu kurz. Das RNA/DNA-Hybrid zeigt zusammen mit dem äquivalenten dsDNA-Substrat TS75/TS76 die niedrigste Hybridisierungsrate. Dies kann durchaus mit der Länge von 92 bp zusammen hängen. Nicht nur die Länge selbst, aber auch die Bewegung der Moleküle in der Reaktion erschweren die Hybridisierung und die Stabilisierung. Ebenso kann sich die Komplexität der Substratstruktur (Abbildung 26) auf die Hybridisierung auswirken. Eventuell würde die Hybridisierung eines vergleichbar langen Substrats mit möglichst einfacher Struktur, effizienter verlaufen. Die Erkenntnis, dass die Länge der Nukleinsäuren die Affinität des Proteins beeinflussen kann, wurde bereits für das

Nukleinsäurechaperon C2-L1Tc aus dem L1Tc Retrotransposon gewonnen. Hierbei erhöhte sich jedoch dessen Affinität mit der steigende Länge der Nukleinsäuren (Heras et al., 2009). Auch für das Nukleocapsid aus HIV-1 konnte in verschiedenen Studien die effiziente Hybridisierung eines 93 bp langen Oligonukleotids (Tsuchihashi und Brown, 1994) sowie von 149 bp und 136 bp langen Substraten nachgewiesen werden (Dib-hajj et al., 1993). Darüber hinaus ist das A1 hnRNP Protein in der Lage ein 124mer mit bis zu 3000-facher Rate zu hybridisieren. Dies ist ein Extrembeispiel, aber auch das *Mason Pfizer Monkey Virus* (MPMV) Nukleocapsid ist befähigt Substrate mit einer Länge von 149 bp effektiv zu hybridisieren (Dib-hajj et al., 1993) und das Einzelstrang-bindende Protein (SSB Protein) aus *E. coli* katalysiert die Hybridisierung von Substraten mit ca. 200 bp Länge (Pontius und Berg, 1990). Daher wäre für weitere Untersuchungen die Analyse eines langen, aber strukturell einfachen Substrates aufschlussreich.

In keiner der Versuchsreihen konnte eine vollständige Hybridisierung der Nukleinsäuren beobachtet werden. Dies wurde u.a. auch schon für das HIV-1 Nukleocapsid (Tsuchihashi und Brown, 1994) sowie für das ORF1-Protein des Maus LINE1-Retrotransposons (Martin und Bushman, 2001) beschrieben. Dabei ist eine Komplexbindung der Proteine durchaus denkbar, wobei mehrere Proteine ein Nukleinsäuremolekül binden und somit abschirmen, sodass die Hybridisierung mit einem weiteren Nukleinsäuremolekül erschwert wird. In teilweiser Verbleib der Nukleinsäuren in den Taschen der PAA-Gele bei sehr hohen nAvd-Konzentrationen wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet und könnte auf solch eine Komplexbildung hinweisen. Eine weitere Möglichkeit für eine unvollständige Hybridisierung wäre, dass ein Protein mehrere Nukleinsäuren bindet, ähnlich wie es ebenfalls für das Nukleocapsid aus HIV-1 beobachtet werden konnte (Tsuchihashi und Brown, 1994). Beispielsweise hybridisiert das StpA-Protein aus *E. coli* RNA nur durch gleichzeitiges Binden der beiden zu hybridisierenden RNA-Moleküle an ein Protein (Mayer et al., 2007). Darüber hinaus ist es denkbar, dass ein Gleichgewicht der Reaktion in einem bestimmten Verhältnis benötigt wird. Beispielsweise benötigen das HIV-1 Nukleocapsid für eine optimale Hybridisierung ein Sättigungslevel der Proteine (Dib-hajj et al., 1993; Lapadat-Tapolsky et al., 1995).

Bei Strukturanalysen der bAvd wurde ein hoher Anteil an basischen Oberflächenaminoacids entdeckt, was die hohe Affinität zu Nukleinsäuren erklären würde (Alayyoubi et al., 2013). Die basischen Bestandteile des HIV-1 Nukleocapsid wurden direkt mit dessen Hybridisierungsaktivität in Zusammenhang gebracht (Stewart-Maynard et al., 2008; Tsuchihashi und Brown, 1994; Wu et al., 2014). Auch das basische ORF1-Protein des Maus LINE-1 Retrotransposons katalysiert die Hybridisierung von einzelsträngigen DNA-Molekülen. Durch diese Bindung und dem Formieren von Multimeren (Kolosha und Martin, 1997) ist es möglich, dass die DNA-Moleküle durch eine Protein-

Protein-Interaktion zusammengebracht werden. Dabei neutralisiert das ORF1-Protein die negative Ladung des Phosphatrückgrats, sodass es zu einer Abschirmung der Ladung kommt (Martin und Bushman, 2001). Durch die hier durchgeführten Versuche konnte mit Hilfe des DNA-bindenden Proteins BSA demonstriert werden, dass die beschriebene Hybridisierungsaktivität jedoch keine generelle Eigenschaft von DNA-bindenden Proteinen ist (3.2.3, sowie Abbildung 20, Abbildung 35-Abbildung 38).

#### **4.2.4 Die nAvd weist keine Strangaustauschaktivität auf**

Neben der Fähigkeit Nukleinsäuren zu hybridisieren wurde zudem untersucht, ob die nAvd den Austausch von Nukleinsäuren katalysieren kann. Viele Nukleinsäurechaperone, wie das HIV-1 Nukleocapsid oder auch das ORF1-Protein aus dem Maus LINE-1 Retrotransposon, sind neben der Hybridisierung von Nukleinsäuren in der Lage Strangaustausche zu katalysieren (Martin und Bushman, 2001; Tsuchihashi und Brown, 1994). Ein aktiver Strangaustausch, wie ihn beispielsweise das RecA-Protein während der Rekombination ausführt, ist ATP abhängig (Cox et al., 2005; Lusetti und Cox, 2002). Da dies für viele Nukleinsäurechaperone in vorherigen Studien ausgeschlossen werden konnte (Lapadat-Tapolsky et al., 1995; Tsuchihashi und Brown, 1994), ist ein ATP-anhängiger Strangaustausch auch für die nAvd fraglich. Die meisten Nukleinsäurechaperone hybridisieren den stabilsten Doppelstrang, also den Doppelstrang mit der maximalen Anzahl an komplementären Basenpaaren, indem sie die perfekt hybridisierten Basenpaare erkennen und stabilisieren (Lapadat-Tapolsky et al., 1995; Martin und Bushman, 2001; Tsuchihashi und Brown, 1994; Williams et al., 2001). Darüber hinaus ist es auch denkbar, dass, im Falle von einem Doppelstrang, der aus zwei unterschiedlich langen Strängen besteht, ein langer Einzelstrang an das freie Ende des instabilen Doppelstranges hybridisiert, und der kürzere Strang letztendlich ersetzt wird (Martin und Bushman, 2001).

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden zwei verschiedene Substrate unter verschiedenen Bedingungen in Anlehnung an Tsuchihashi und Brown analysiert. Hierbei wurde in einem Versuchsansatz untersucht, ob die nAvd die Destabilisierung eines instabileren Doppelstrangs unterstützt, indem sie die Bildung eines stabileren Doppelstrangs katalysiert. In einem zweiten Versuchsansatz wurde untersucht, ob die nAvd einen stabilen Doppelstrang stabilisiert. Dazu wurden unterschiedliche Inkubationszeiten, verschiedene nAvd-Konzentrationen und zwei verschiedene Pufferbedingungen getestet. Jedoch konnte kein durch die nAvd katalysierter Strangaustausch beobachtet werden. Eventuell konnten in diesen Versuchsreihen auch noch nicht die optimalen Bedingungen für die nAvd geschaffen werden, sodass durch Optimierungen ein Strangaustausch nachgewiesen werden könnte. Die Fähigkeit der nAvd generell Strangaustausche zu katalysieren, würde vor allem im Mechanismus 4 der Retrotransposition von DGRs, der homologen Rekombination,

Anwendung finden (Abbildung 33). Hier könnte die nAvd den Austausch des Sense-Strangs katalysieren. Für den Fall, dass die nAvd tatsächlich nicht in der Lage sein sollte Strangaustausche zu katalysieren, könnte dies die Mechanismen 1-3 unterstützen, da hier ein Strangaustausch in diesem Sinne nicht nötig ist.

Nimmt man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zusammen, scheint die nAvd Doppelstränge zu stabilisieren, unabhängig davon, wie stabil oder instabil diese sind. Diese Theorie wird auch von der nicht nachweisbaren Helikaseaktivität unterstützt (Schillinger, 2013). Hierbei wurden Versuche vergleichbar mit den hier beschriebenen Hybridisierungsversuchen durchgeführt, wobei eine dsDNA in Chaperon-Reaktionspuffer inkubiert wurde (Schillinger, 2013). Hierbei konnte keine Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge durch die nAvd beobachtet werden.

#### **4.2.5 Die nAvd ist selbst thermostabil und stabilisiert Nukleinsäuren unter Hitzestress**

Viele Nukleinsäurechaperone beeinflussen die Stabilität von Nukleinsäuren. Während die Nukleocapside aus HIV-1, M-MLV und *Rous sarcoma* Virus (RSV) Nukleinsäuren unter Hitzestress destabilisieren (Cruceanu et al., 2006; Stewart-Maynard et al., 2008; Tsuchihashi und Brown, 1994), ist das ORF1 Protein des Maus LINE1 Retrotransposons in der Lage perfekte Doppelstränge zu stabilisieren und Doppelstränge mit Fehlpaarungen zu destabilisieren (Martin und Bushman, 2001). Auch die nAvd nimmt Einfluss auf die Stabilität von doppelsträngigen Nukleinsäuren, indem sie diese unter Hitzestress stabilisiert. Da Proteine im nativen Zustand aber auch denaturiert durch Ladungsabschirmung zur Stabilität von Nukleinsäuren beitragen können, wurde dies in weiterführenden Versuchen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die nAvd unter Hitzestress auch selbst aktiv ist und anschließend in der Lage ist Nukleinsäuren zu hybridisieren. *Nostoc sp.* PCC 7120 ist ein mesophiles Bakterium, welches bevorzugt zwischen 20-45 °C wächst (Cimdins et al., 2014). Auch wenn es durchaus in extremeren Habitaten aufgefunden werden kann, ist eine solche Stabilität der nAvd bei Temperaturen bis zu 95 °C äußerst bemerkenswert. Die Stabilität eines Proteins hängt von einer Kombination aus verschiedenen Faktoren ab, wie der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbrücken, einem effizienten *core packing*, der Oligomerisierung, den hydrophoben Resten, der Größe und der Struktur (Chakravarty und Varadarajan, 2000; Razvi und Scholtz, 2006; Sterner und Liebl, 2001). Die bAvd wurde als pentamere Faserstruktur, die aus Vier-Helix-Monomeren besteht und eine sanduhrförmige Pore im Zentrum aufweist, beschrieben (Alayyoubi et al., 2013). Auch die nAvd konnte als tertiäre oder pentamere Faserstruktur mit zentraler Pore identifiziert werden (Schillinger, 2013). Es ist denkbar, dass diese

kompakte Struktur zur Stabilität der Avd beiträgt. Zudem besteht mehr als die Hälfte der bAvd-Proteinoberfläche aus hydrophoben Resten (Alayyoubi et al., 2013), welche ebenfalls maßgeblich an der Proteinfaltung und Struktur beteiligt sind und ebenfalls zur Stabilität eines Proteins beitragen (Tanford, 1997). Die einzelnen Monomere sind darüber hinaus durch Wasserstoff- und Salzbrücken miteinander verbunden, auch wenn diese, verglichen mit den hydrophoben Resten, weniger wichtig für die Struktur zu sein scheinen (Alayyoubi et al., 2013). Zwar handelt es sich bei der nAvd nicht um die gleichen hydrophoben Reste wie bei der bAvd, jedoch wurden hydrophobe Aminosäuren durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt (Schillinger, 2013). Die Größe eines Proteins scheint sich ebenfalls auf dessen Stabilität auszuwirken, da hitzebeständige Proteine im Schnitt kleiner sind als mesophile (Chakravarty und Varadarajan, 2000; Thompsen und Eisenberg, 1999). Da die nAvd mit 14,5 kDa zu den kleineren Proteinen zählt, trägt dies vermutlich zu deren Stabilität bei. Somit ist für die enorme Stabilität der nAvd offenbar auch die Kombination verschiedener Eigenschaften verantwortlich.

Durch die hohe Stabilität der nAvd unter Hitzestress ist sie in der Lage währenddessen und im Anschluss an die Stresssituation Nukleinsäuren zu hybridisieren; sie verliert ihre Hybridisierungsaktivität somit nicht. Ferner stabilisiert die nAvd doppelsträngige DNA-Moleküle unter Hitzestress. Daher ist für die oben beschriebene Hilfsfunktion (4.2.2) die Stabilisierung der einzelnen Nukleinsäurezwischenstufen denkbar. Da bisher nur die Stabilisierung doppelsträngiger DNA-Moleküle untersucht wurde, sind weiterführende Analysen von beispielsweise RNA/DNA-Hybriden oder auch *gapped* dsDNA-Molekülen von großem Interesse, da diese Formen in den potentiellen Mechanismen der Retrotransposition von DGRs vorkommen können und eine Stabilisierung durch die nAvd durchaus möglich wäre.

#### **4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse des akzessorischen Proteins Alr3496 aus *Nostoc sp.* PCC7120**

Nukleinsäurechaperone können verschiedene Funktionen, wie das Hybridisieren, Stabilisieren, Destabilisieren oder Austauschen von Nukleinsäuren, aufweisen. Im Falle der nAvd konnten in verschiedenen Studien, wie auch in dieser Arbeit, einige dieser Aktivitäten nachgewiesen und genauer beschrieben werden. Die nAvd bindet ssDNA und RNA/DNA-Hybride höchst effizient; dsDNA und ssRNA Moleküle werden weniger effizient gebunden. Verglichen mit anderen Proteinen weist die nAvd generell eine effiziente Bindung an Nukleinsäuren auf. Eigentlich wirken Proteine, die eine stärkere Bindung an ssDNA als dsDNA-Moleküle haben Nukleinsäure-destabilisierend (Stewart-Maynard et al., 2008; Williams et al., 2001). Bei der nAvd verhält es sich jedoch gegensätzlich, denn zwar bindet sie

ssDNA-Moleküle höchst effizient, dennoch stabilisiert sie ebenfalls dsDNA-Moleküle bei Hitzestress. Hitzebeständigkeit ist ein sehr nützliches Werkzeug und in der Biotechnologie von hohem Interesse, bedenkt man beispielsweise eine der wichtigsten Methoden heutzutage: die PCR. Daher hat die nAvd, und auch der Organismus *Nostoc sp.* PCC 7120, das Potential als Werkzeug in der Biotechnologie oder als Modellorganismus in der Grundlagenforschung Verwendung zu finden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse der diversen Versuche lassen auf eine Nukleinsäurepräferenzen der nAvd schließen, da verschiedene Nukleinsäuren mit unterschiedlicher Effizienz gebunden und hybridisiert werden (4.2.2 und 4.2.3). Möglicherweise katalysiert die nAvd die Hybridisierung von TR-RNA und VR-DNA im *mutagenic Homing* Prozess. Neben dieser Funktion wäre es auch denkbar, dass das Hybridisieren als Korrekturmechanismus fehlerhaft gefalteter DNA oder RNA Moleküle fungiert (Tsuchihashi und Brown, 1994). In dieser Arbeit konnte kein Hinweis auf einen vollständigen Strangaustausch gefunden werden. Diese Tatsache unterstützt die potentiellen Mechanismen 1-3 nach Medhekar und Miller (2007), da bei den TPRT-ähnlichen Mechanismen mit Replikation (1), oder bei einem Einzelstrang-(2) oder Doppelstrangbruch (3) kein vollständiger Strangaustausch nötig wäre.

Die verschiedenen Ergebnisse der nAvd als Nukleinsäurechaperon legen diverse Hilfsfunktionen nahe, wie beispielweise als Lotse, um die TR-RNA und die VR in räumliche Nähe zu bringen. Ebenfalls wäre es denkbar, dass die nAvd die RT und den Templat-Primer-Komplex zusammen lotst, um dadurch die cDNA-Synthese zu unterstützen. Darüber hinaus ist eine stabilisierende Funktion der verschiedenen Nukleinsäurezwischenstufen durch die nAvd denkbar. Diese Theorie wird vor allem durch die beobachtete Hybridisierungsaktivität und die Stabilisierung von Nukleinsäuren unter Hitzestress wie auch der nicht nachweisbaren Strangaustausch- und Helikaseaktivität (Schillinger, 2013) unterstützt. Insgesamt unterstreichen die hier gewonnenen Ergebnisse mit der Rolle der nAvd als vielseitiges Nukleinsäurechaperon die Wichtigkeit der akzessorischen Proteine für die Retrotransposition.

### **4.3 Interaktion zwischen RT und Avd**

Alayyoubi und Kollegen konnten mittels Deletionsanalysen zeigen, dass ein Zusammenspiel von bAvd und bRT wichtig für den *Homing* Prozess ist. Vor allem zwei Aminosäurereste an der Oberfläche der bAvd, welche auch für ihre Aktivität entscheidend sind, scheinen eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit der bRT zu spielen. Darüber hinaus ist eine willkürliche Interaktion sehr unwahrscheinlich, da sowohl die bRT als auch die bAvd positiv geladen sind, sodass es sich vermutlich um eine gerichtete Interaktion handelt. Bei einer solchen Interaktion ist eine Beeinflussung der bRT-Aktivität durch die bAvd denkbar. Jedoch zeigten entsprechende Versuche, dass die bAvd die Aktivität

der bRT nicht erhöhte, sondern sogar geringfügig verminderte. Dies wird möglicherweise durch ein Konkurrieren der bAvd und bRT um Templat und Primer verursacht (Alayyoubi et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls entsprechende Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse auch keine Steigerung der nRT-Aktivität durch die nAvd zeigten. Teilweise wurde auch eine Verminderung der nRT-Aktivität beobachtet, was sich mit den Ergebnissen von Alayyoubi und Kollegen deckt. Möglicherweise kann durch eine Optimierung des molaren Verhältnisses zwischen nAvd und nRT die Verminderung der nRT-Aktivität vermieden und gegebenenfalls eine Steigerung der nRT-Aktivität beobachtet werden. Eine weitere Interaktionsmöglichkeit könnte sein, dass die bAvd als Bindeglied zwischen bRT und der Nukleinsäure dient und somit die diversen Schritte des Retrohomings koordiniert; angefangen von der reversen Transkription bis hin zur Inkorporation der mutagenisierten cDNA in die VR (Alayyoubi et al., 2013). Diese These unterstützt die hier aufgestellte Theorie, dass die nAvd mit der Funktion als Lotse räumliche Nähe zwischen nRT und dem Templat-Primer-Komplex schafft. Eventuell fehlen in *in vitro*-Versuchen wichtige Faktoren, die in einem komplexeren *in vivo*-System für eine Lotsenfunktion und Zusammenführung vorhanden sind, sodass hier eine Interaktion und Erhöhung der nRT-Aktivität durch die nAvd durchaus möglich wäre.

Die hohe Hitzestabilität der nAvd stellt einen enormen Gegensatz zu der Instabilität der nRT da. Vermutlich ist die nRT *in vivo* ebenfalls deutlicher stabiler. *In vitro* konnten jedoch keine optimalen Bedingungen geschaffen werden.

#### 4.4 Biologische Funktionen des *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR-Systems

Mit den hier gewonnenen Ergebnissen stellt sich die Frage nach der biologischen Funktion des DGR-Systems aus *Nostoc sp.* PCC 7120. Außer der konkreten Funktion des DGR-Systems aus dem *Bordetella*-Phagen konnten DGR-Systeme bis dato nur sehr abstrakt beschrieben werden. Genetische Änderungen gehen mit Anpassungen einher, sodass die Hypermutation von exakt definierten Zielgenen der Anpassung an schnell auftretende Änderungen in der Umwelt oder des Wirtsorganismus dient. Inwiefern nimmt nun das DGR-System aus *Nostoc sp.* PCC 7120 auf seinen Wirt und dessen Anpassungsfähigkeit Einfluss? Cyanobakterien sind regelmäßig diversen Stressfaktoren wie Temperaturschwankungen und Hitzestress, Veränderungen der Osmolarität, Nährstoffversorgung, pH-Wertes oder Lichtintensität ausgesetzt (Cimdins et al., 2014). Obwohl die meisten Cyanobakterien, wie auch *Nostoc sp.* PCC 7120, mesophile Temperaturen bevorzugen, können sie auch in extremen Habitaten aufgefunden werden, wodurch eine Anpassung an Hitzestress notwendig wird. Möglicherweise trägt das DGR-System aus *Nostoc sp.* PCC 7120 dazu bei, denn vor allem die hier gewonnenen Ergebnisse der Stabilitätsversuche der nAvd deuten auf eine solche Anpassung hin.

Die Hypermutation von DGR wurde in früheren Studien mit dem Jäger-Beute-Modell verglichen. Hierbei binden Proteine bestimmte Zielrezeptoren und fungieren als Jäger oder werden selbst gebunden und dienen als Beute. Dabei müssen sich Jäger diversifizieren, um neue Ziele zu binden, während Beuteproteine sich diversifizieren müssen, um nicht gebunden zu werden (McMahon et al., 2005; Schillinger und Zingler, 2012). Für das Zielgen aus dem *Nostoc sp.* PCC 7120 DGR wäre die Rolle als Beute denkbar, da es sich diversifiziert, um nicht selbst von Cyanophagen befallen zu werden. Im Falle von *Trichodesmium* wird ebenfalls vermutet, dass die Hypermutation der Zielgene eine Fluchtstrategie vor Bakteriophagen ist, indem multiple Oberflächenmoleküle diversifiziert werden (Pfreundt et al., 2014) und auch das marine Cyanobacterium *Prochlorococcus* nutzt Genmutationen als Fluchtstrategien (Avrani et al., 2011). Weitere Analysen des Zielgenes aus *Nostoc sp.* PCC 7120 könnten Aufschluss über diese Fluchttheorie geben. Hierbei wären spezielle Versuche, vergleichbar mit den Analysen der Oberflächenproteine von *Bordetella*, von Interesse, um eine Änderung der Oberflächenproteine von *Nostoc sp.* PCC 7120 zu untersuchen. Dazu könnten die Oberflächenproteine von *Nostoc sp.* PCC 7120 in der Anwesenheit der Cyanophage N-1, welche den Genus *Nostoc* befällt, beobachtet und nach möglichen resistenten Mutanten selektiert werden. Darüber hinaus wäre für die Gattung *Nostoc* natürlich auch die Anpassung an neue Symbiosepartner (Rasmussen und Svenning, 1998) von großem Nutzen und daher eine Möglichkeit die bedacht werden muss, denn *Nostoc* verfügt über die Fähigkeit neue Symbiosen einzugehen.

Die Analyse diverser Zielgene aus verschiedenen DGR-Systemen ist erforderlich, um weitere Wirkungsmechanismen von DGRs in der Natur zu verstehen. Es wird keine universelle Funktion für die verschiedenen Zielproteine geben, sodass neben den bis dato beschriebenen Oberflächenproteine des *Bordetella* Phagen und *Legionella pneumophila* (Arambula et al., 2013; Liu et al., 2002) auch andere Proteinklassen diversifiziert werden könnten. Zukünftig werden mit der Entdeckung von DGRs in weiteren Organismen andere Funktionen analysiert und somit ein detailliertes Bild von DGRs und deren Bedeutung wiedergegeben werden.

#### **4.5 Abschließender Kommentar**

Mit dem ersten Hinweis auf eine nRT-Aktivität und der detaillierten Charakterisierung der nAvd wurden wichtige Fortschritte in der Analyse und dem Verständnis von DGRs erzielt. Neben dem DGR aus dem *Bordetella*-Phagen war es noch nicht möglich, DGR-Systeme in anderen Organismen im Detail zu untersuchen. Der Nachweis der nRT-Aktivität bringt hierbei einen bedeutenden Erfolg, auch wenn in den hier durchgeführten Versuchen keine Hypermutation durch die nRT nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ging durch den fehlenden Selektionsdruck bei der Lagerung von *Nostoc sp.*

PCC 7120 in Kultur die Hypermutationskompetenz der nRT verloren. Auch die Charakterisierung der nAvd als Nukleinsäurechaperon mit diversen Funktionen trägt zum Verständnis des DGR-Systems bei, wobei die nAvd eine mögliche Funktion als Lotse durch die Bindung verschiedener Nukleinsäuren erfüllt. Ferner konnte die Hybridisierung verschiedener Nukleinsäuren durch die nAvd gezeigt werden. Ebenso konnte eine außergewöhnliche Hitzestabilität der nAvd selbst, sowie deren Fähigkeit Nukleinsäuren unter Hitzestress zu stabilisieren, beobachtet werden. Mit diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem DGR des *Bordetella*-Phagen nicht um einen Einzelfall handelt, sondern womöglich generelle Bedeutung für eine Vielzahl der DGR-Systeme hat. In naher Zukunft werden weitere DGR-Systeme untersucht und dabei der DGR-Mechanismus detaillierter offengelegt. Auch die beiden DGR-Systeme des *Bordetella*-Phagen und aus *Nostoc sp.* PCC 7120 verdienen als Modellorganismen weiter detaillierte Analysen. Zudem ist die Anwendungsmöglichkeit in der Biotechnologie nicht nur wegen der einzigartigen Funktion ein definiertes Gen zu hypermutieren, sondern auch wegen der erstaunlich hohen Hitzestabilität der nAvd groß.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abramovitz, D.L., Pyle, A.M., 1997. Remarkable morphological variability of a common RNA folding motif: the GNRA tetraloop-receptor interaction. *J. Mol. Biol.* 266, 493–506. doi:10.1006/jmbi.1996.0810
- Akerley, B.J., Cotter, P. a, Miller, J.F., 1995. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the Bordetella-host interaction. *Cell* 80, 611–20.
- Alayyoubi, M., Guo, H., Dey, S., Golnazarian, T., Brooks, G. a, Rong, A., Miller, J.F., Ghosh, P., 2013. Structure of the essential diversity-generating retroelement protein bAvd and its functionally important interaction with reverse transcriptase. *Structure* 21, 266–76. doi:10.1016/j.str.2012.11.016
- Arambula, D., Wong, W., Medhekar, B. a, Guo, H., Gingery, M., Czornyj, E., Liu, M., Dey, S., Ghosh, P., Miller, J.F., 2013. Surface display of a massively variable lipoprotein by a Legionella diversity-generating retroelement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8212–7. doi:10.1073/pnas.1301366110
- Auld, D.S., Kawaguchi, H., Livingston, D.M., Vallee, B.L., 1974. RNA-Dependent DNA Polymerase (Reverse Transcriptase) from Avian Myeloblastosis Virus : A Zinc Metalloenzyme. *PNAS* 71, 2091–2095.
- Avery, O., MacLeod, C., McCarty, M., 1943. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J Exp Med* 79, 137–158.
- Avrani, S., Wurtzel, O., Sharon, I., Sorek, R., Lindell, D., 2011. Genomic island variability facilitates Prochlorococcus-virus coexistence. *Nature* 474, 604–8. doi:10.1038/nature10172
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–11.
- Bancroft, I., Smith, R.J., 1988. An analysis of restriction endonuclease sites in cyanophages infecting the heterocystous cyanobacteria Anabaena and Nostoc. *J. Gen. Virol.* 69 ( Pt 3), 739–43.
- Bandwar, R.P., Jia, Y., Stano, N.M., Patel, S.S., 2002. Kinetic and Thermodynamic Basis of Promoter Strength : Multiple Steps of Transcription Initiation by T7 RNA Polymerase Are Modulated by the Promoter. *Biochemistry* 41, 3586–3595. doi:10.1021/bi0158472
- Bernstein, D.A., Keck, J.L., 2005. Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure* 13, 1173–82. doi:10.1016/j.str.2005.04.018
- Bibillo, A., Eickbush, T.H., 2004. End-to-End Template Jumping by the Reverse Transcriptase Encoded by the R2 Retrotransposon \*. *J. Biol. Chem.* 279, 14945–14953. doi:10.1074/jbc.M310450200
- Boch, J., 2011. TALEs of genome targeting. *Nat. Publ. Gr.* 29, 135–136. doi:10.1038/nbt0211-135

- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U., 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–12. doi:10.1126/science.1178811
- Bonen, L., Vogel, J., 2001. The ins and outs of group II introns. *Trends Genet.* 17, 322–31.
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E. V, van der Oost, J., 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* (80-. ). 321, 960–964. doi:10.1126/science.1159689
- Carroll, D., 2011. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genet. Soc. Am.* 188, 773–782. doi:10.1534/genetics.111.131433
- Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R.M., Terns, M.P., 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22, 3489–3496. doi:10.1101/gad.1742908
- Chakravarty, S., Varadarajan, R., 2000. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS* 470, 5–9.
- Chénaïs, B., Caruso, A., Hiard, S., Casse, N., 2012. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene* 509, 7–15. doi:10.1016/j.gene.2012.07.042
- Chiang, C., Kennell, J.C., Wanner, L.A., Lambowitz, A.M., 1994. A mitochondrial retroplasmid integrates into mitochondrial DNA by a novel mechanism involving the synthesis of a hybrid cDNA and A Mitochondrial Retroplasmid Integrates into Mitochondrial DNA by a Novel Mechanism Involving the Synthesis of a Hybrid cDNA a. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6419–6432. doi:10.1128/MCB.14.10.6419
- Chueh, A.C., Northrop, E.L., Brettingham-Moore, K.H., Choo, K.H.A., Wong, L.H., 2009. LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. *PLoS Genet.* 5, e1000354. doi:10.1371/journal.pgen.1000354
- Cimdins, A., Klinkert, B., Aschke-sonnenborn, U., Kaiser, F.M., Kortmann, J., Narberhaus, F., 2014. Translational control of small heat shock genes in mesophilic and thermophilic cyanobacteria by RNA thermometers. *RNA Biol.* 11, 594–608.
- Cohen, S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* 263, 731–738.
- Conrad, L., 2013. Biochemische Charakterisierung von alr3496, einem akzessorischen Protein des diversitätsgenerierenden Retroelements aus *Nostoc* sp. PCC7120.
- Cost, G.J., Feng, Q., Jacquier, A., Boeke, J.D., 2002. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J.* 21, 5899–910.
- Costa, M., Michel, F., 1995. Frequent use of the self-folding RNAs same tertiary motif by. *EMBO J.* 14, 1276–1285.
- Cox, J.M., Tsodikov, O. V, Cox, M.M., 2005. Organized Unidirectional Waves of ATP Hydrolysis within a RecA Filament. *PLoS Biol.* 3, 0231–0243. doi:10.1371/journal.pbio.0030052

- Crick, F.H., 1966. Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19, 548–55.
- Cruceanu, M., Urbaneja, M.A., Hixson, C. V, Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J., Casas-finet, J.R., Rein, A., Rouzina, I., Williams, M.C., 2006. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* 34, 593–605. doi:10.1093/nar/gkj458
- D'Aquila, R.T., Summers, W.C., 1989. HIV-1 reverse transcriptase/ribonuclease H: high level expression in *Escherichia coli* from a plasmid constructed using the polymerase chain reaction. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2, 579–87.
- Dahm, R., 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev. Biol.* 278, 274–88. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.028
- Dale, G.E., Broger, C., Langen, H., D'Arcy, A., Stüber, D., 1994. Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements : solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase . *Protein Eng.* 7, 933–9.
- Das, D., Georgiadis, M.M., 2001. A directed approach to improving the solubility of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Cold Spring Harb. Protein Sci.* 10, 1936–1941. doi:10.1101/ps.16301
- Das, D., Georgiadis, M.M., 2004. The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure* 12, 819–29. doi:10.1016/j.str.2004.02.032
- Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F., Cotter, P. a, 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol. Microbiol.* 40, 669–83.
- Dib-hajj, F., Khan, R., Giedroc, D.P., 1993. Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity. *Protein Sci.* 2, 231–243.
- Dicarlo, J.E., Norville, J.E., Rios, X., Aach, J., Church, G.M., 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 41, 4336–4343. doi:10.1093/nar/gkt135
- Ding, S., Voinnet, O., 2007. Review Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 130, 413–426. doi:10.1016/j.cell.2007.07.039
- Dombroski, B.A., Feng, Q., Mathias, S.L., Sassaman, D.M., Scott, A.F., Kazazian, H.H., Boeke, J.E.F.D., 1994. An In Vivo Assay for the Reverse Transcriptase of Human Retrotransposon Li in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4485–4492.
- Doolittle, W.F., Sapienza, C., 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284, 601–603.
- Doulatov, S., Hodes, A., Dai, L., Mandhana, N., Liu, M., Deora, R., Simons, R.W., 2004. Tropism switching in *Bordetella* bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. *Nature* 431, 476–481. doi:10.1038/nature02844.1.
- Dunlap, C.A., Tsai, M., 2002. Use of 2-Aminopurine and Tryptophan Fluorescence as Probes in Kinetic Analyses of DNA Polymerase  $\beta$  †. *Biochemistry* 41, 11226–11235. doi:10.1021/bi025837g

- Eickbush, T.H., Jamburuthugoda, V.K., 2008. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res.* 134, 221–34. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.010
- Esposito, F., Corona, A., Tramontano, E., 2012. HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target : Structure , Function , Classical Inhibitors , and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Mol. Biol. Int.* 2012, 1–23. doi:10.1155/2012/586401
- Fauci, A.S., 1987. The Human Immunodeficiency Virus : Infectivity and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* (80-. ). 239, 617–622.
- Feng, Q., Moran, J. V, Kazazian, H.H., Boeke, J.D., 1996. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905–16.
- Feschotte, C., 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat. Rev. Genet.* 9, 397–405. doi:10.1038/nrg2337
- Fox, J.D., Routzahn, K.M., Bucher, M.H., Waugh, D.S., 2003. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS* 537, 53–57. doi:10.1016/S0014-5793
- Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A., Weissbach, A., 1972. A New Synthetic RNA-Dependent DNA Polymerase from Human Tissue Culture Cells. *PNAS* 69, 452–455.
- Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., George, M., Calarco, J.A., 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10, 741–743. doi:10.1038/nmeth.2532
- Galligan, J., Kennell, J., 2007. Retroplasmids: Linear and circular plasmids that replicate via reverse transcription. Berlin/heidelb. Springer; 163–185.
- Gillis, A.J., Schuller, A.P., Skordalakes, E., 2008. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* 455, 633–7. doi:10.1038/nature07283
- Gopalakrishnan, V., Peliska, J.A., Benkovic, S.J., 1992. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase : Spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *PNAS* 89, 10763–10767.
- Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., Connor-giles, K.M.O., 2013. Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics* 194, 1029–1035. doi:10.1534/genetics.113.152710
- Guo, H., Tse, L. V, Barbalat, R., Sivaamnuaiphorn, S., Xu, M., Doulatov, S., Miller, J.F., 2008. Diversity-Generating Retroelement Homing Regenerates Target Sequences for Repeated Rounds of Codon Rewriting and Protein Diversification. *Mol. Cell* 31, 813–823. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.022
- Guo, H., Tse, L. V, Nieh, A.W., Czornyj, E., Williams, S., Oukil, S., Liu, V.B., Miller, J.F., 2011. Target site recognition by a diversity-generating retroelement. *PLoS Genet.* 7, e1002414. doi:10.1371/journal.pgen.1002414
- Guo, X., Li, X., 2015. Targeted genome editing in primate embryos. *Nat. Publ. Gr.* 25, 767–768. doi:10.1038/cr.2015.64

- Han, J.S., Boeke, J.D., 2005. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bioessays* 27, 775–84. doi:10.1002/bies.20257
- Hani, J., Feldmann, H., 1998. tRNA genes and retroelements in the yeast genome. *Nucleic Acids Res.* 26, 689–696.
- Heras, S.R., Thomas, M.C., Macias, F., Patarroyo, M.E., Alonso, C., López, M.C., 2009. Nucleic-acid-binding properties of the C2-L1Tc nucleic acid chaperone encoded by L1Tc retrotransposon. *Biochem. J.* 424, 479–90. doi:10.1042/BJ20090766
- Hershey, A.D., Chase, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36, 39–56.
- Hoffman, A.D., Banapour, B., Levy, J.A., 1985. Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology* 147, 326–335.
- Hölscher, K., Richter-Roth, M., Felden de Neumann, B., 2006. Addition of imidazole during binding improves purity of histidine-tagged proteins. Freiburg, Germany.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Shengdar, Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.J., Joung, J.K., 2013. Efficient In Vivo Genome Editing Using RNA-Guided Nucleases. *Nat Biotechnol.* 31, 227–229. doi:10.1038/nbt.2501
- Ikeuchi, M., Tabata, S., 2001. *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70, 73–83. doi:10.1023/A:1013887908680
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H., Li, E.A., 1993. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. Biochem.* 90, 6320–6324.
- Jakubczak, J.L., Burke, W.D., Eickbush, T.H., 1991. Retrotransposable elements RI and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 3295–3299.
- Jansen, R., Embden, J.D.A. Van, Gaastra, W., Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., Weeks, D.P., 2013. Demonstration of CRISPR / Cas9 / sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–12. doi:10.1093/nar/gkt780
- Johnson, B.H., Hecht, M.H., 1994. Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Biotechnology. (N. Y.)* 12, 1357–60.
- Kajikawa, M., Ichiyanagi, K., Tanaka, N., Okada, N., 2005. Isolation and characterization of active LINE and SINEs from the eel. *Mol. Biol. Evol.* 22, 673–82. doi:10.1093/molbev/msi054
- Kapust, R.B., Waugh, D.S., 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668–1674.
- Kazazian, H.H., 1998. Mobile elements and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 343–350.

- Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626–32. doi:10.1126/science.1089670
- Kazazian, H.H., Goodier, J.L., 2002. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 110, 277–80.
- Klarmann, G.J., Smith, R.A., Schinazi, R.F., North, T.W., Preston, B.D., 2000. Site-specific Incorporation of Nucleoside Analogs by HIV-1 Reverse Transcriptase and the Template Grip Mutant P157S. *J. Biol. Chem.* 275, 359–366.
- Kohlstaedt, L., Wang, J., Friedman, J., Rice, P., Steitz, T., 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* (80- ). 256, 1783–1790. doi:10.1126/science.1377403
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A., 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783–90.
- Kolosha, V.O., Martin, S.L., 1997. In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 10155–10160.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., Kuriyan, J., 1992. Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69, 425–37.
- Kotewicz, M.L., Sampson, C.M., Alessio, J.M.D., Gerard, G.F., 1988. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res.* 16, 265–277.
- Krishna, T.S.R., Kong, X.-P., Gary, S., Burgers, P.M., Kuriyan, J., 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233–1243. doi:10.1016/0092-8674(94)90014-0
- Kuehnen, P., Mischke, M., Wiegand, S., Sers, C., Horsthemke, B., Lau, S., Keil, T., Lee, Y.-A., Grueters, A., Krude, H., 2012. An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet.* 8, e1002543. doi:10.1371/journal.pgen.1002543
- Lambert, G.R., Carr, N.G., 1984. Resistance of DNA from filamentous and unicellular cyanobacteria to restriction endonuclease cleavage. *Biochim. Biophys. Acta* 781, 45–55.
- Lambowitz, A.M., Zimmerly, S., 2004. Mobile Group II Introns. *Annu. Rev. Genet.* 38, 91600. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091600
- Lampson, B.C., Viswanathan, M., Inouye, M., Inouye, S., 1990. Reverse Transcriptase from *Escherichia coli* Exists as a Complex with msDNA and Is Able to Synthesize Double-stranded DNA \*. 1990 265, 8490–8496.
- Lapadat-Tapolsky, M., Pernelle, C., Borie, C., Darlix, J.L., 1995. Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 23, 2434–41.

- Le Coq, J., Ghosh, P., 2011. Conservation of the C-type lectin fold for massive sequence variation in a *Treponema* diversity-generating retroelement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14649–53. doi:10.1073/pnas.1105613108
- Leblanc, P., Dastugue, B., Vaury, C., 1999. The Integration Machinery of ZAM, a Retroelement from *Drosophila melanogaster*, Acts as a Sequence-Specific Endonuclease. *J. Virol.* 73, 7061–7064.
- Lee, E., Iskow, R., Yang, L., Gokcumen, O., Haseley, P., Luquette, L.J., Lohr, J.G., Harris, C.C., Ding, L., Wilson, R.K., Wheeler, D. a, Gibbs, R. a, Kucherlapati, R., Lee, C., Kharchenko, P. V, Park, P.J., 2012. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* 337, 967–71. doi:10.1126/science.1222077
- Liu, M., Deora, R., Doulatov, S.R., Gingery, M., Eiserling, F. a, Preston, A., Maskell, D.J., Simons, R.W., Cotter, P. a, Parkhill, J., Miller, J.F., 2002. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage. *Science* 295, 2091–4. doi:10.1126/science.1067467
- Liu, M., Gingery, M., Doulatov, S.R., Liu, Y., Hodes, A., Baker, S., Davis, P., Simmonds, M., Churcher, C., Mungall, K., Quail, M.A., Preston, A., Harvill, E.T., Maskell, D.J., Eiserling, F.A., Parkhill, J., Miller, J.F., 2004. Genomic and Genetic Analysis of *Bordetella* Bacteriophages Encoding Reverse Transcriptase-Mediated Tropism-Switching Cassettes. *J. Bacteriol.* 186, 1503–1517. doi:10.1128/JB.186.5.1503
- Liu, Z., Macias, M.J., Bottomley, M.J., Stier, G., Linge, J.P., Nilges, M., Bork, P., Sattler, M., 1999. The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the Werner and Bloom syndrome proteins. *Structure* 7, 1557–66. doi:10.1016/S0969-2126(00)88346-X
- Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., Eickbush, T.H., 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72, 595–605.
- Lusetti, S., Cox, M.M., 2002. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem.* 71, 71–100.
- Lynch, M., Conery, J., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* (80-). 290, 1151–5.
- Maitra, M., Gudzelak, A., Li, S., Matsumoto, Y., Eckert, K.A., Jager, J., Sweasy, J.B., 2002. Threonine 79 Is a Hinge Residue That Governs the Fidelity of DNA Polymerase  $\beta$  by Helping to Position the DNA within the Active Site \*. *J. Biol. Chem.* 277, 35550–35560. doi:10.1074/jbc.M204953200
- Mansky, L.M., Temin, H.M., 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087–94.
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J., 2011. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet.* 11, 181–190. doi:10.1038/nrg2749
- Martin, S.L., Bushman, F.D., 2001. Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein from the Mouse LINE-1 Retrotransposon. *Mol. Cell. Biol.* 21, 467–475. doi:10.1128/MCB.21.2.467
- Martínez-Abarca, F., Barrientos-Durán, A., Fernández-López, M., Toro, N., 2004. The Rmlnt1 group II intron has two different retrohoming pathways for mobility using predominantly the nascent

- lagging strand at DNA replication forks for priming. *Nucleic Acids Res.* 32, 2880–2888. doi:10.1093/nar/gkh616
- Mathias, S.L., Scott, a F., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., Gabriel, a, 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808–10.
- Matsuura, M., Saldanha, R., Ma, H., Wank, H., Yang, J., Mohr, G., Cavanagh, S., Dunny, G.M., Belfort, M., Lambowitz, a. M., 1997. A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron. *Genes Dev.* 11, 2910–2924. doi:10.1101/gad.11.21.2910
- Mattoo, S., Foreman-Wykert, A.K., Cotter, P.A., Miller, J.F., 2001. Mechanisms of Bordetella Pathogenesis. *Front. Biosci.* 6, 168–186. doi:10.2741
- Mayer, O., Rajkowitsch, L., Lorenz, C., Konrat, R., 2007. RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Res.* 35, 1257–1269. doi:10.1093/nar/gkl1143
- McClintock, B., 1956. Controlling Elements and the Gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21, 197–216.
- McMahon, S. a, Miller, J.L., Lawton, J. a, Kerkow, D.E., Hodes, A., Marti-Renom, M. a, Doulatov, S., Narayanan, E., Sali, A., Miller, J.F., Ghosh, P., 2005. The C-type lectin fold as an evolutionary solution for massive sequence variation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 886–92. doi:10.1038/nsmb992
- Medhekar, B., Miller, J.F., 2007. Diversity-generating Retroelements. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 388–395. doi:10.1016/j.mib.2007.06.004
- Miller, J.L., Le Coq, J., Hodes, A., Barbalat, R., Miller, J.F., Ghosh, P., 2008. Selective ligand recognition by a diversity-generating retroelement variable protein. *PLoS Biol.* 6, e131. doi:10.1371/journal.pbio.0060131
- Minot, S., Grunberg, S., Wu, G.D., Lewis, J.D., Bushman, F.D., 2012. Hypervariable loci in the human gut virome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3962–6. doi:10.1073/pnas.1119061109
- Möller, P., 2015. Identifizierung von diversitätsgenerierenden Retroelementen ( DGRs ) in Cyanobakterien und strukturelle Charakterisierung der Templat RNA eines DGRs aus dem Cyanobakterium *Nostoc. Kaiserslautern, Germany.*
- Moré, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Chiorse, W.C., Madsen, E.L., 1994. Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572–1580.
- Morgenstern, L., 2014. Aufreinigung und Biochemische Charakterisierung der zwei essentiellen Proteine aus dem Diversitäts-generierenden Retroelement aus *Nostoc sp. PCC 7120. Kaiserslautern, Germany.*
- Orgel, L.E., Crick, F.H.C., 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604–607.
- Pakebusch, C., 2014. Charakterisierung der Aktivität des Nukleinsäure-Chaperons nAvd aus *Nostoc sp. PCC 7120. Kaiserslautern, Germany.*

- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. a, Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K. a, Deal, C., Baker, C.C., Di Francesco, V., Howcroft, T.K., Karp, R.W., Lunsford, R.D., Wellington, C.R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, a R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M.H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., Guyer, M., 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19, 2317–23. doi:10.1101/gr.096651.109
- Pfreundt, U., Kopf, M., Belkin, N., Berman-Frank, I., Hess, W.R., 2014. The primary transcriptome of the marine diazotroph *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Sci. Rep.* 4, 6187. doi:10.1038/srep06187
- Pontius, B.W., Berg, P., 1990. Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein : Implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 8403–8407.
- Porteus, M.H., Carroll, D., 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 23, 967–73. doi:10.1038/nbt1125
- Prabakaran, P., An, J., Gromiha, M.M., Selvaraj, S., Uedaira, H., Kono, H., Sarai, A., 2001. Thermodynamic database for protein-nucleic acid interactions ( ProNIT ). *Bioinformatics* 17, 1027–1034.
- Preston, B.D., Poiesz, B.J., Loeb, L.A., 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242, 1168–71.
- Pronk, L.M., Sanderson, K.E., 2001. Intervening sequences in rrl genes and fragmentation of 23S rRNA in genera of the family Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 183, 5782–7. doi:10.1128/JB.183.19.5782-5787.2001
- Ralph, D., McClelland, M., 1993. Intervening sequence with conserved open reading frame in eubacterial 23S rRNA genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. Microbiology* 90, 6864–6868.
- Rasmussen, U., Svenning, M.M., 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 265–72.
- Razvi, A., Scholtz, J.M., 2006. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* 15, 1569–1578. doi:10.1110/ps.062130306
- Repanas, K., Zingler, N., Layer, L.E., Schumann, G.G., Perrakis, A., Weichenrieder, O., 2007. Determinants for DNA target structure selectivity of the human LINE-1 retrotransposon endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 35, 4914–26. doi:10.1093/nar/gkm516
- Ricchetti, M., Buc, H., 1993. E.coli DNA polymerase I as a reverse transcriptase. *EMBO J.* 12, 387–396.
- Roberts, J.D., Bebenek, K., Kunkel, T.A., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171–3.
- Roth, M.J., Tanese, N., Goff, S.P., 1985. Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse Transcriptase Expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 9326–9335.

- Saigo, K., Kugimiya, W., Matsuo, Y., Inouye, S., Yoshioka, K., Yuki, S., 1984. Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme in a transposable genetic element in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 312, 659–661.
- Sarafianos, S.G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D., Michael, A., Hughes, S.H., Arnold, E., 2010. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol* 385, 693–713. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.071
- Schillinger, T., 2013. Diversitätsgenerierende retroelemente – Identifikation, Klassifizierung, Phylogenie und in vitro -Funktionsanalysen. Kaiserslautern, Germany.
- Schillinger, T., Lisfi, M., Chi, J., Cullum, J., Zingler, N., 2012. Analysis of a comprehensive dataset of diversity generating retroelements generated by the program DiGrEF. *BMC Genomics* 13, 430. doi:10.1186/1471-2164-13-430
- Schillinger, T., Zingler, N., 2012. The low incidence of diversity-generating retroelements in sequenced genomes. *Mob. Genet. Elements* 287–291.
- Simon, D.M., Zimmerly, S., 2008. A diversity of uncharacterized reverse transcriptases in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 36, 7219–29. doi:10.1093/nar/gkn867
- Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* 169, 415–29. doi:10.1016/j.virusres.2012.06.015
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 4, 1. doi:10.1186/1475-2859-4-1
- Sterner, R., Liebl, W., 2001. Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 36, 39–106.
- Stewart-Maynard, K.M., Cruceanu, M., Wang, F., Vo, M., Gorelick, R.J., Williams, M.C., Rouzina, I., Musier-forsyth, K., 2008. Retroviral Nucleocapsid Proteins Display Nonequivalent Levels of Nucleic Acid Chaperone Activity. *J. Virol.* 82, 10129–10142. doi:10.1128/JVI.01169-08
- Stockbauer, K.E., Fuchslocher, B., Miller, J.F., Cotter, P. a, 2001. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. *Mol. Microbiol.* 39, 65–78.
- Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Gordenin, D.A., Resnick, M.A., 2007. RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338–341. doi:10.1038/nature05720
- Tanford, C., 1997. How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Sci.* 6, 1358–1366.
- Temin, H.M., 1989. Reverse transcriptases. *Retrons in bacteria.* *Nature* 339, 254–5. doi:10.1038/339254a0
- Temin, H.M., Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211–3.
- Thompson, M.J., Eisenberg, D., 1999. Transproteomic evidence of loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.* 292, 946. doi:10.1006/jmbi.1999.2889

- Tsuchihashi, Z., Brown, P.O., 1994. DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* 68, 5863–70.
- Uhl, M. a, Miller, J.F., 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15, 1028–36.
- Vagenende, V., Yap, M.G.S., Trout, B.L., 2009. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry* 48, 11084–11096. doi:10.1021/bi900649t
- Van Embden, J.D.A., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van der Zeijst, B.A.M., Schouls, L.M., 2000. Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2393–2401.
- Vestergaard, G., Garrett, R.A., Shah, S.A., 2014. CRISPR adaptive immune systems of Archaea. *RNA Biol.* 11, 156–167.
- Villaverde, A., Carrió, M.M., 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25, 1385–95.
- Vogel, S.K., Schulz, A., Rippe, K., H, È., Feld, I.N., 2002. Binding affinity of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma$  54 holoenzyme for the *glnA p2*, *nif H* and *nif L* promoters. *Nucleic Acids Res.* 30, 4094–4101.
- Volff, J.-N., 2006. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays* 28, 913–22. doi:10.1002/bies.20452
- Vuillard, L., Braun-bretont, C., Rabilloudt, T., 1995. Non-detergent sulphobetaines : a new class of mild solubilization agents for protein purification. *Biochem. J.* 343, 337–343.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R., 2014. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 153, 910–918. doi:10.1016/j.cell.2013.04.025
- Watson, J., Crick, F., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738.
- Waugh, D.S., 2016. Crystal structures of MBP fusion proteins . *Protein Sci.* 25, 559–71. doi:10.1002/pro.2863
- Weis, W.I., Kahn, R., Fourme, R., Drickamer, K., Hendrickson, W.A., 1991. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254, 1608–15.
- West, N.J., Adams, D.G., 1997. Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4479–84.
- Williams, M.C., Rouzina, I., Wenner, J.R., Gorelick, R.J., Musier-forsyth, K., Bloomfield, V.A., 2001. Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching. *PNAS* 98, 6121–6126.

- Woese, C.R., Winker, S., Gutell, R.R., 1990. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8467–71.
- Wong, I., Lohmam, T.M., 1993. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5428–5432.
- Wood, W.I., Gitschier, J., Lasky, L.A., Lawn, R.M., 1985. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride : A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1585–1588.
- Wu, H., Mitra, M., Naufer, M.N., Mccauley, M.J., Gorelick, R.J., Rouzina, I., Musier-forsyth, K., Williams, M.C., 2014. Differential contribution of basic residues to HIV-1 nucleocapsid protein ' s nucleic acid chaperone function and retroviral replication. *Nucleic Acids Res.* 42, 2525–2537. doi:10.1093/nar/gkt1227
- Xiong, Y., Eickbush, T.H., 1990. Origin and evolution of retroelements based their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9, 3353–3362.
- Yakovchuk, P., Protozanova, E., Frank-kamenetskii, M.D., 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* 34, 564–574. doi:10.1093/nar/gkj454
- Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., James, E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* (80- ). 339, 823–826. doi:10.1126/science.1232033
- Ye, Y., 2014. Identification of diversity-generating retroelements in human microbiomes. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 14234–46. doi:10.3390/ijms150814234
- Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Papke, R.T., 2006. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes : Quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* 1099–1108. doi:10.1101/gr.5322306.16
- Zimmerly, S., Guo, H., Perlman, P.S., Lambowitz, A.M., 1995. Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription. *Cell* 82, 545–54.

**Abkürzungsverzeichnis**

(v/v)	Volumenkonzentration
(w/v)	Massenkonzentration
*	radioaktiv markiert
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A	Adenin
AMP	Ampicillin
Avd	Accessory variation domain
bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
Cas	CRISPR-assoziiert
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Counts per Minute

CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Elemente
DGR	Diversitätsgenerierende Retroelemente
DiGReF	Diversity-generating retroelement finder
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
DUF	Domäne unbekannter Funktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunden
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IMH	Initiation of Mutagenic Homing

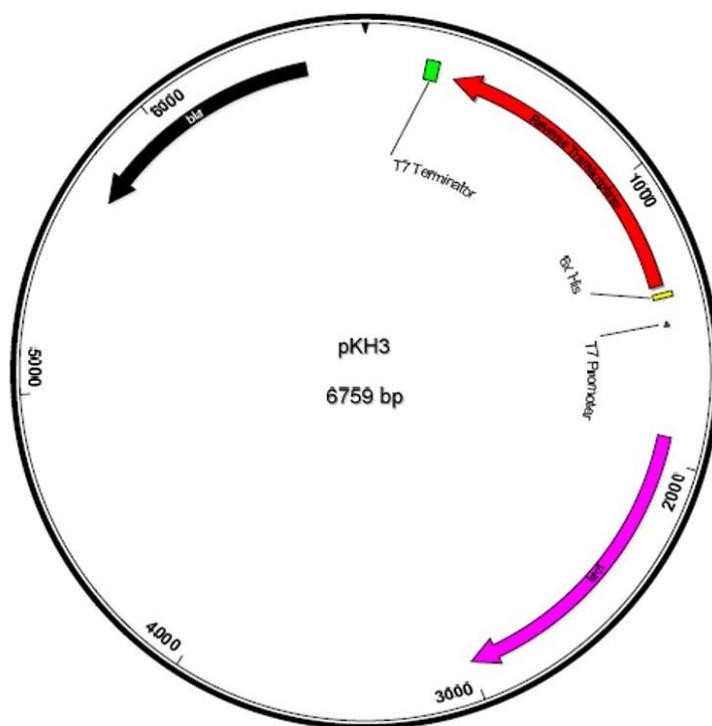
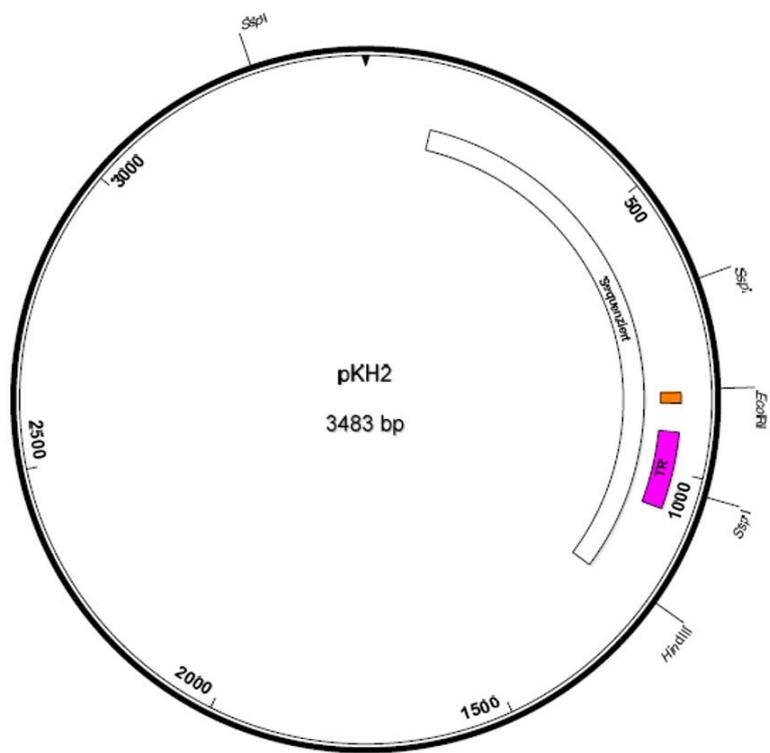
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LINE1/L1	Long Interspersed Element 1
M	Molar
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murines Leukämievirus
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nm	Nanometer

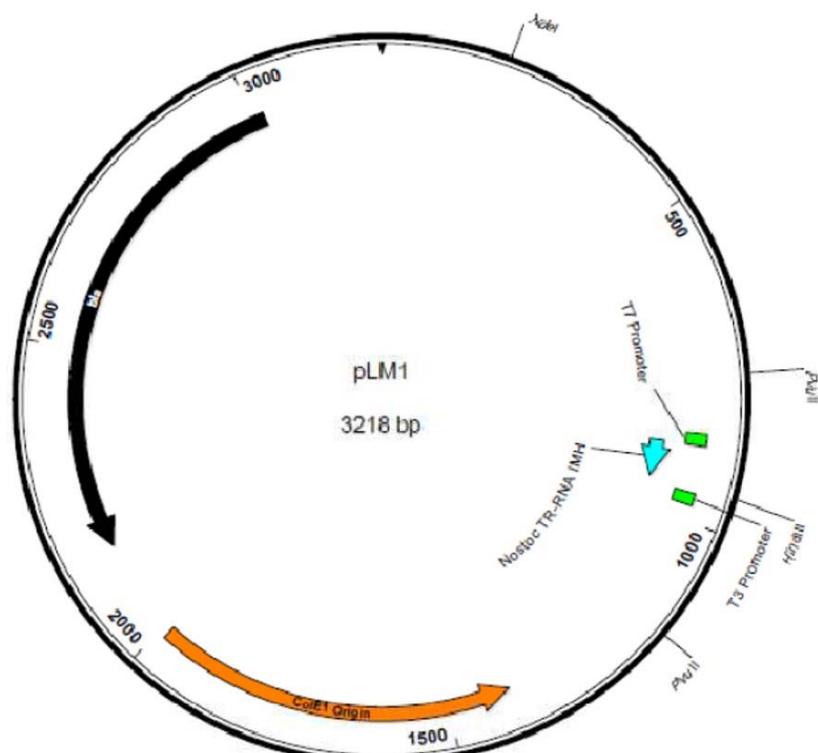
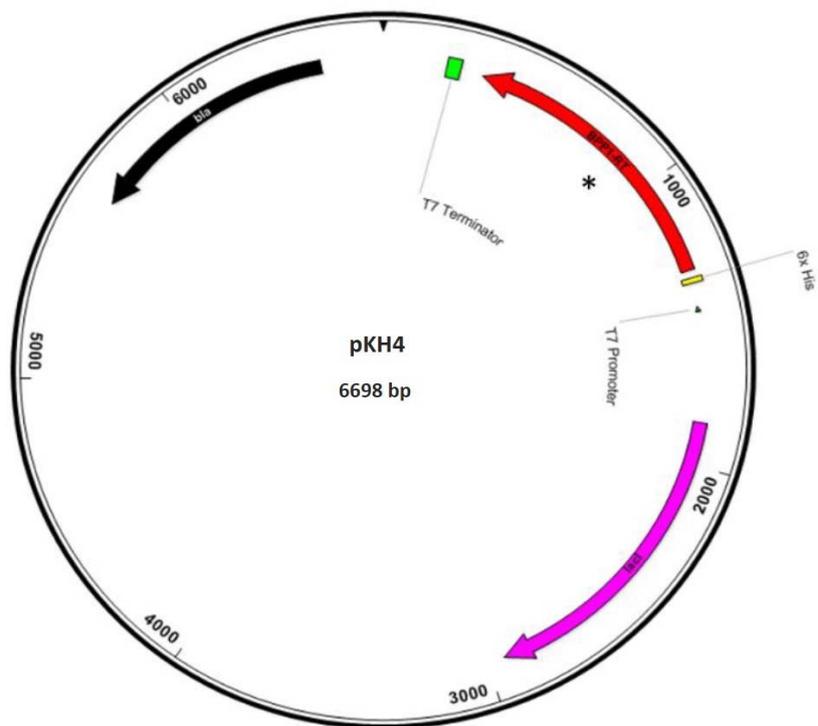
nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriacetic Acid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nM
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Aktivität in Lösungen (pH Wert)
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelsträngig
SSB Protein	Einzelstrang-bindendes Protein
T	Thymin

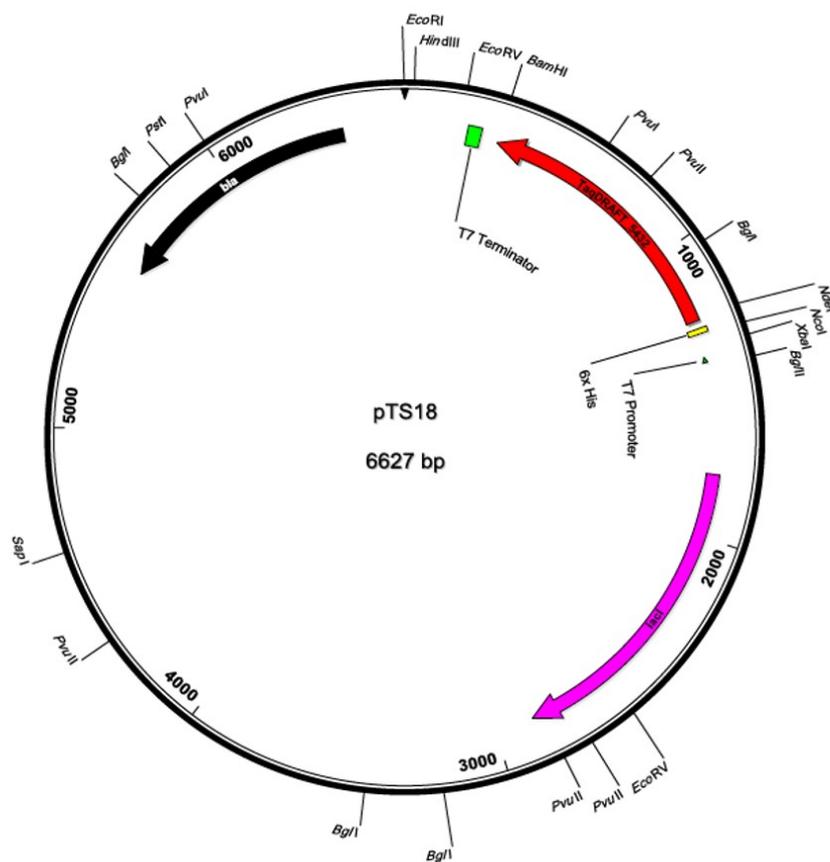
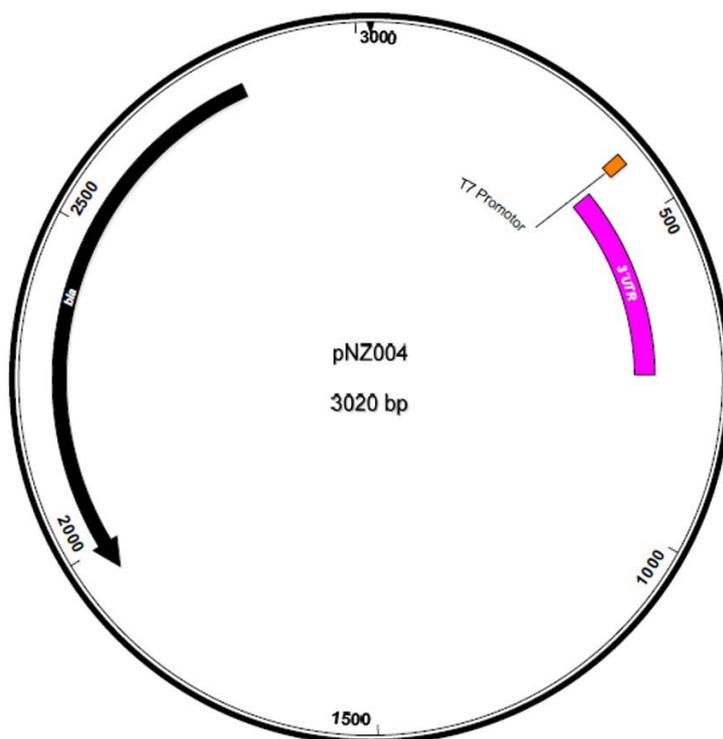
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TALEN	transkriptionsaktivatorartige Effektornuklease
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPRT	Target-Primed Reverse Transcription
TR	Template Repeat
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
ÜN	Über Nacht
V	Volt
VR	Variable Region
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel
ZFN	Zinkfingernuklease

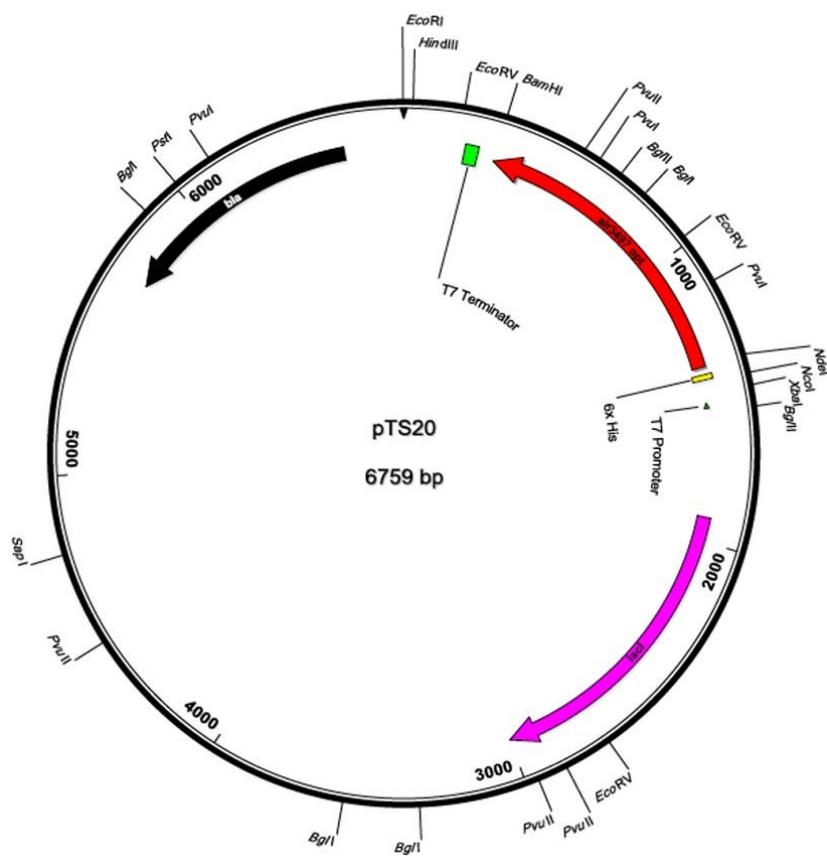
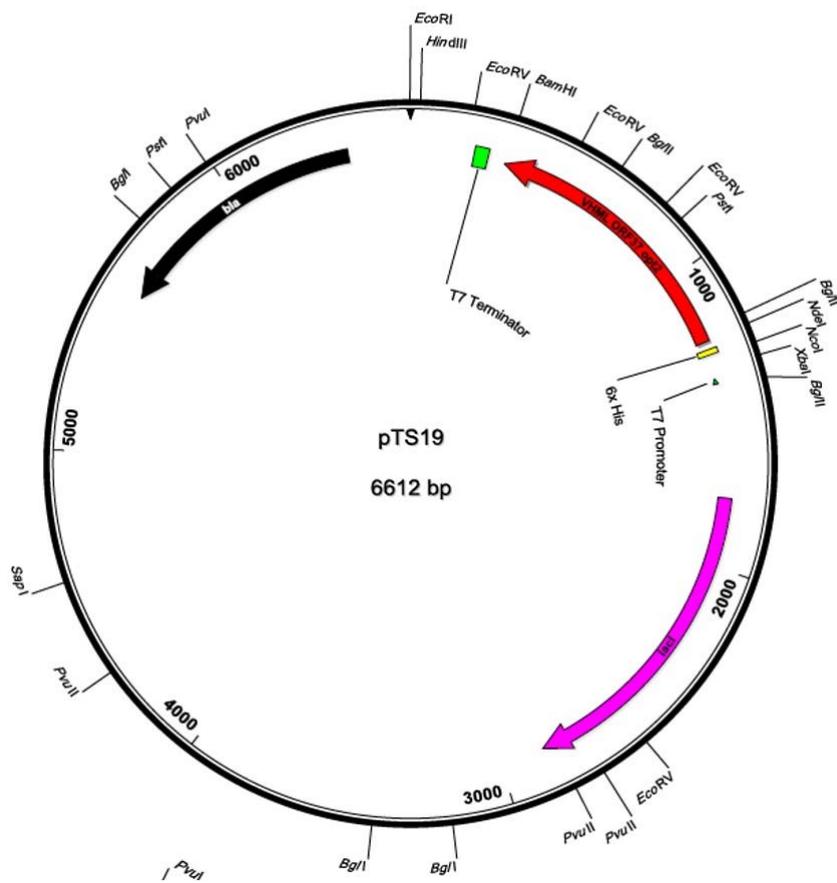
# Anhang

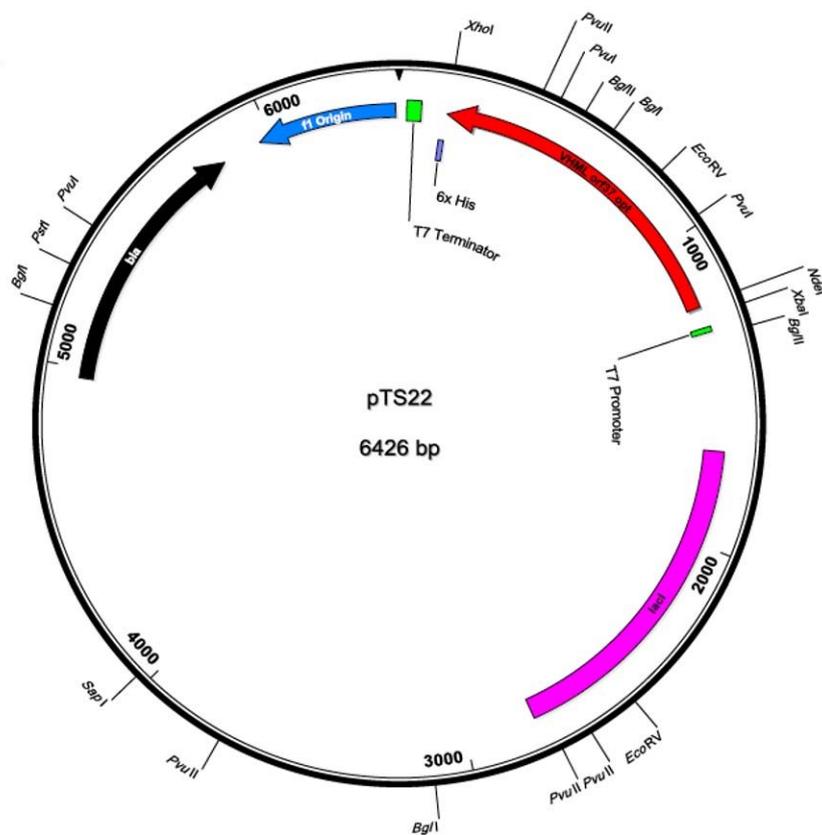
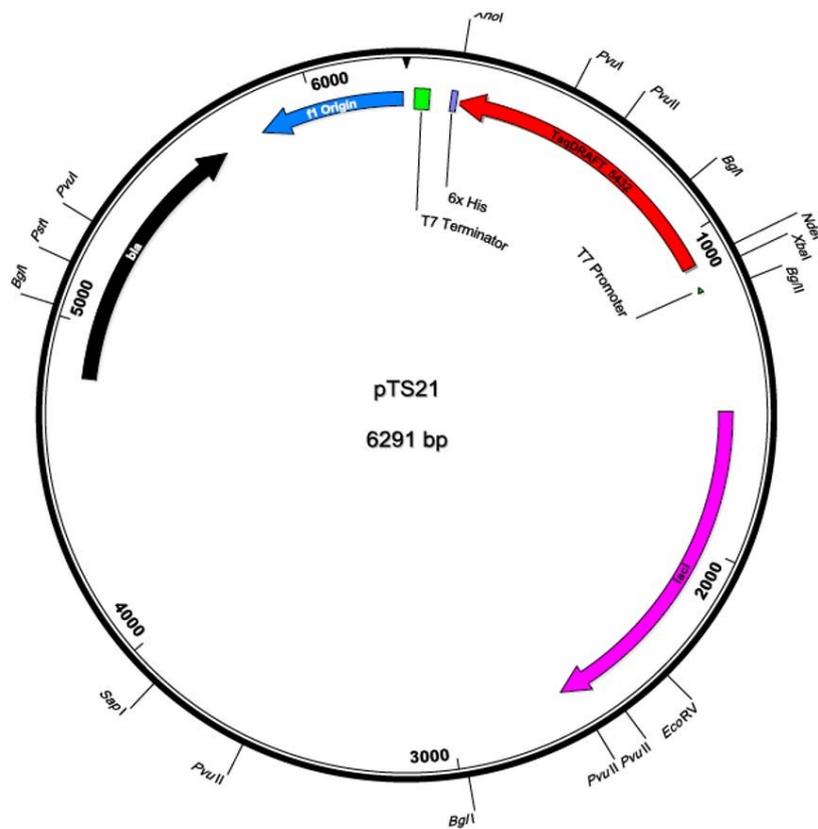
## I. Vektorkarten

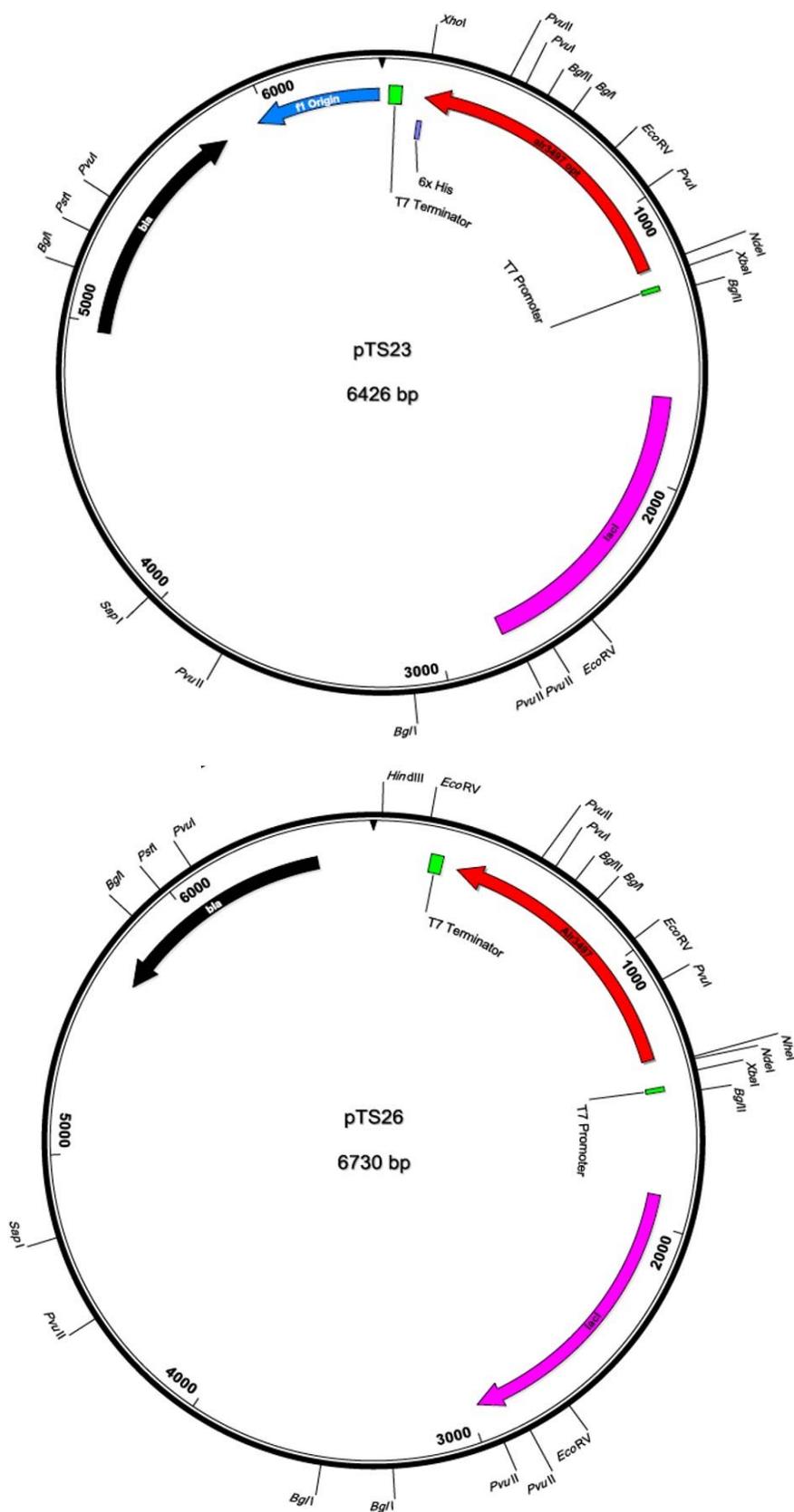


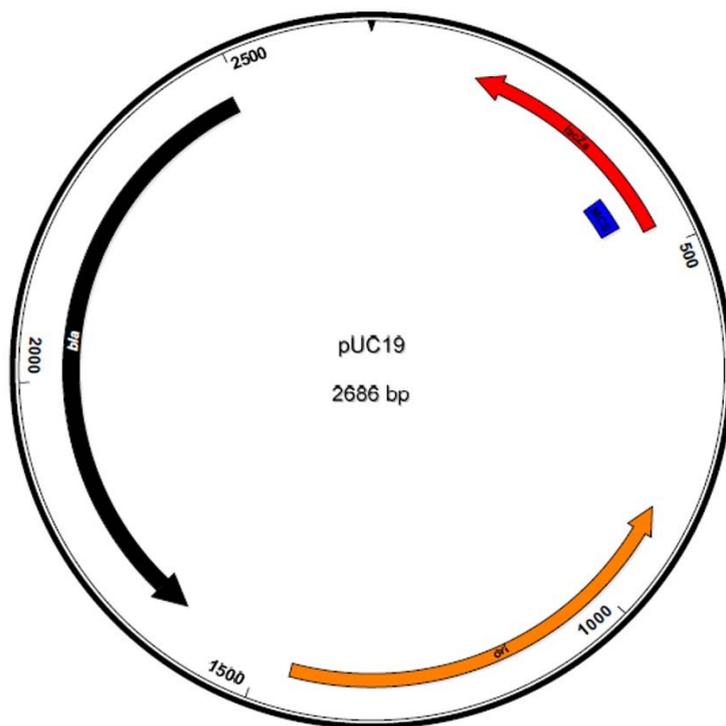
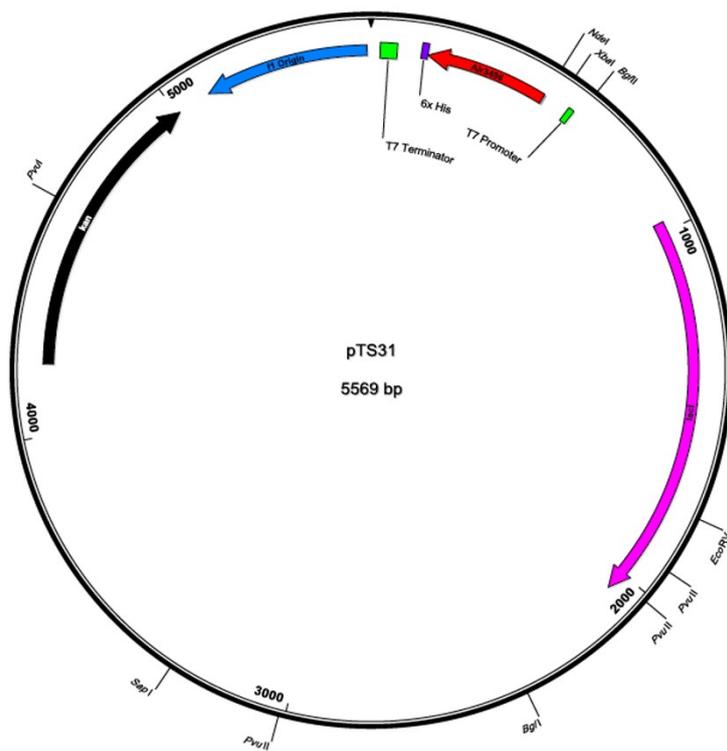












## II. Zu den Versuchen der reversen Transkriptase

### II.I Vergleich der RT-Wildtypsequenzen aus *Nostoc sp.* PCC 7120 sowie dem *Bordetella*-Phagen mit den Mutanten D135Q (pKH3) bzw. D138Q (pKH4).

Die mutierten Basen sind in rot dargestellt.

#### ***Nostoc sp.* PCC 7120 RT**

Wildtypsequenz

```
ACCCATTCCGCGCGTAACTCCCCGTACGTTCTGCAATGCGATATCCGTAAGTACTTCCCATCAATTGACCACA  
ACCCATTCCGCGCGTAACTCCCCGTACGTTCTGCAATGC CAGATCCGTAAGTACTTCCCATCAATTGACCACA
```

D135Q (pKH3)

#### ***Bordetella* Phagen RT**

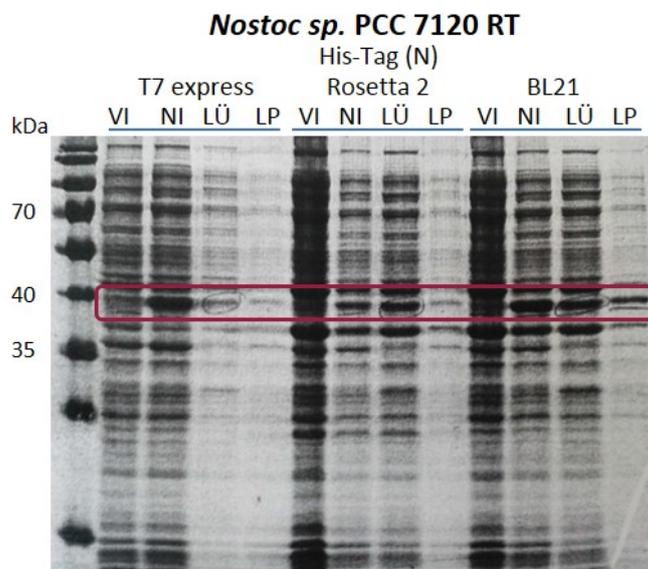
Wildtypsequenz

```
GCGCCGTACGCGTGCGACTCACTTCCTGAAAAGCGACTTTTCCAAGTTCTTTCCGTCGATTGATCGCGCGGC  
GCGCCGTACGCGTGCGACTCACTTCCTGAAAAGC CAGTTTCCAAGTTCTTTCCGTCGATTGATCGCGCGGC
```

D138Q (pKH4)

## II.II Expressionsvergleich der nRT in verschiedenen Zellen

In Abbildung 34 ist die Überexpression der *Nostoc sp.* PCC 7120 RT (pKH3) in verschiedenen kompetenten *E. coli* Zellen.



**Abbildung 34: Vergleich der Expression der *Nostoc sp.* PCC 7120 RT von pKH3 in verschiedenen Zellen.** . Die Überexpression wurde durch die Zugabe von 100 µM IPGT induziert. Nach der Expression über Nacht bei 16 °C und 200 rpm folgten Zellernte, Zellyse und Zentrifugation. Die Teilproben vor der Induktion (VI), nach der Induktion (NI), des Überstandes und des Pellets nach der Zellyse (LÜ und LP) wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt. Die Expression von dem Konstrukt pKH3 nRT mit 6x His-Tag am N-Terminus (pKH3) erfolgte in verschiedenen kompetenten *E. coli* Zellen: T7 express, Rosetta II (DE3) und BL21 (DE3). Als Laufkontrolle wurden Proteinmarker (M, PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die dunkelroten Rechtecke markieren die exprimierten reversen Transkriptasen. Die blauen Linien verdeutlichen, welche Proben von einem Typ kompetenter Zellen stammen.

## II.III Dialysepuffer

In Tabelle 18 sind die Zusammensetzungen der verschiedenen getesteten Dialysepuffer zur Stabilisierung der nRTs aufgelistet.

Tabelle 18: Getestete Dialysepuffer zur Stabilisierung der *Nostoc* sp. PCC 7120 RT

Dialysepuffer	Zusammensetzung
DP1	40 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 10 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP2	40 mM Tris-HCl, pH 8,0 / 50 mM NaCl/ 4 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP3	50 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 150 mM NaCl/ 2 mM DTT / 50 % Glycerol
DP4	40 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 50 mM NaCl/ 10 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP5	40 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 50 mM NaCl/ 20 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP6	40 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 20 mM NaCl/ 10 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP7	150 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 20 mM NaCl/ 10 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol
DP8	150 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 10 mM NaCl/ 10 mM MgCl <sub>2</sub> / 2 mM DTT/ 50 % Glycerol

## II.IV Sequenzen von pKH2 und pNZ004 zur Herstellung der RNA-Matrizen der RT-Assays

Grün markiert die Basen des T7 Promotors, blau markiert die HindIII Schnittstelle und Schwarz markiert die TR-Sequenz aus *Nostoc* sp. PCC 7120 (pKH2) bzw. die 3' UTR aus dem eukaryotischen Retrotransposon UnaL2 (*Anguilla japonica*, pNZ004).

### - pKH2:

TAATACGACTCACTATAGGTATTTACTTCCCTCCATTTTAGGAGAAAGTAGAGAAGGGGTAGGCGAACCCGACTG  
CGGGGCGGCTCCTGGAACAACAATCCTGAAAACCTGCCGTTCCGCGTCCCGCAACAACAACAATAGGGCGGAGCGC  
GACAACATCAACAACAATATTGGTTTTTCGTGTTGTCTGCGCGTTCGGGAGTACTCTTCACCGCGAGAGTCGGCAG  
GTGGGAATCTGTGAGAGTGCAACTGAAGAGTCCAGCCTACACCTGTGATGTCGGTGACGATATCCAAATATAAA  
ACCGGGTTGCGTAGCTTGGTAGGCGAAAGCCGAACAGTTGCTCAACCCTACAAGCTT

### - pNZ004:

TAATACGACTCACTATAGGATTAACCACCACCATTCTGTATATTTCACTCTTTAATTTAAAAAAAAAACAAAAA  
AAAAAAAAAACCCCCCCCCCTTTTTTCATGTCACTTGTATTTGTCTTTGTCCCTAATACTGTAGCTTACTCTTCT  
GCCTAGTTGGCTTTGCACAGGTTAGGTTAGAATAGTGTTCACTGTGTGAACTGTGTTCTTAGCTAGAAATAGCTG  
TACAAAATAAGTATTATACCTTTCTGAACTTGTGTTTCAGCAGATGCCTACGACCATGATATGCACCTTTTGTACGT  
CGCTTTGGATAAAAGCGTCTGCGAAATAAATGTAATGTAATGTAAGCTT

### **III. Zu den Versuchen des akzessorischen Proteins**

#### **III.I Übersicht über Eigenschaften der Oligosubstrate**

In Tabelle 19 sind die Sequenzen sowie GC-Gehalt, Länge und Verwendung der Oligosubstrate für die Bindungs- sowie Hybridisierungsstudien der nAvd dargestellt.

Tabelle 19: Oligosubstrate für nAvd Hybridisierungs-, Strangtausch- und Bindungsversuche

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
U117	CGCGGATCCTTAATTGATTACATGAAATTTATATAACAGAATT	Kontextfremd, AT-reich (73 %), 44 bp zur Analyse der Strangtauschaktivität von nAvd; komplementär zu NZ116, 4 bp kürzer
NZ50	GTCGAAACCAGAGGCACTTCTTAGTAGCCCATGGGTAGCGGACCTGGC	Kontextfremd, GC-reich (56 %), 48 bp zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd
NZ51	GCCAGGTCGCCCTACCACATGGGCTACTAAGAATGCTCTCTGGTTTCGAC	Kontextfremd, GC-reich (56 %), 48bp zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd; komplementär zu NZ50
NZ116	GCGGAATTCGTATATAAATTCATGTATCAATTTAAGGATCCGGC	Kontextfremd, AT-reich (67 %), 48 bp Verwendung in Binstudien & zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd
NZ117	CGCGGATCCTTAATTGATTACATGAAATTTATATAACAGAATTCGGC	Kontextfremd, AT-reich (67 %), 48 bp Verwendung in Binstudien & zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd; komplementär zu NZ116
PM129	CCTTTGACTTGTCTTTTTTACTTTTCTGTCCGCTTATGGCGACTCGAATTTTCCACCAAAATATG AAGATTA	AT-reich (66 %), 74 bp, Verwendung in Bindungsstudien, bildet Strukturen beim Hybridisieren mit PM130 bzw. PM134
PM130	TAATCTTCATATTTTGGTGAATAATTCGAAGAAAAGTAAAAAAGAACAAGTACCAAAAG	AT-reich (74 %), 58 bp, Verwendung in Bindungsstudien, bildet Haarnadelstruktur mit PM129 aus

PM134	TAATCTTCATATTTTGGTGA AAAATTTCAGACGGATTAACCGCTGAGAAAAGTAAAAAAGAACAAGT ACAAAAG	AT-reich (66 %), 74 bp, Verwendung in Bindungsstudien, bildet Kreuzstruktur mit PM129 aus
TS75	AATTCATATAGCACTCACTATAGGAGCGCGACACATCAACACATATTTGGTTTTCCGTGTGTCT GGCGGTTCCGGAGTACTCTTCACCA	DNA-Sequenz der pLM1 RNA, 92 bp, AT-reich (55 %) zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd
TS76	AGCTTGGTGAAGAGTACTCCCGAACCGCAGACACACGAAAACCAATATTGTTGATGTTGTCG CGCTCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG	Komplementär zu pLM1-RNA und TS75, 92 bp, AT-reich (55 %) zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd
TS77	TGAAGAGTACTCCCGAACCGCAGACACACGAAAACCA	Vollständig komplementäres Antisense-Oligo für <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120-IMH, GC-Gehalt 50 %, 40 bp, komplementär zu pLM1-RNA, Verwendung in Bindestudien
TS81	AAAAAGTACACAGTCTAACATCAACTCCG	Kontextfremd, AT-reich (62 %), 29 bp zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd
TS82	GGGAGTTGATGTTAGACTGTGACTTTTT	Kontextfremd, AT-reich (62 %), 29 bp zur Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von nAvd, komplementär zu TS81
TS83	GCGAGTTGATGTTAGACTGTGACT	Kontextfremd, AT-reich (73 %), 25 bp zur Analyse der Strangaustauschaktivität von nAvd, komplementär zu TS81, 4 bp kürzer

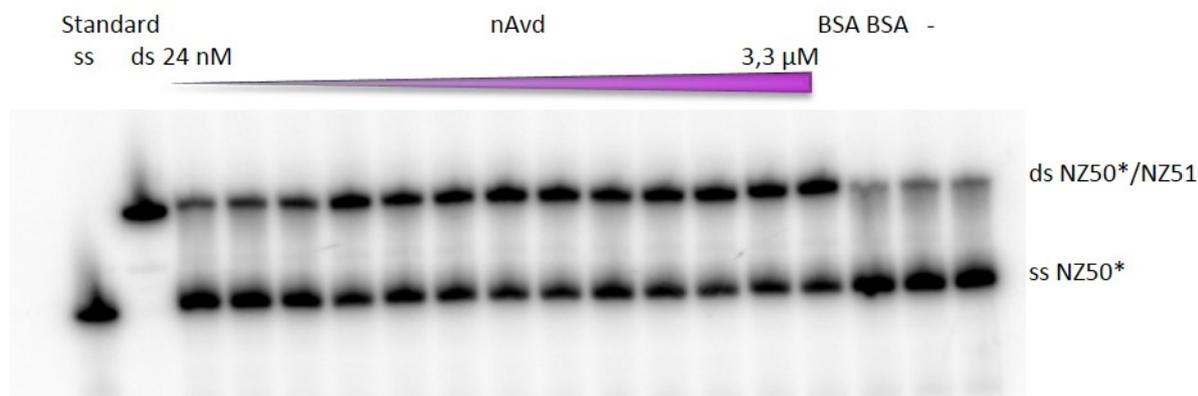
### III.II Bindungsstudien der nAvd

**Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse aller durchgeführten FBAs.** Dargestellt sind die Kd-Werte der verschiedenen Substraten getestet von Dr. Thomas Schillinger (schwarz), Christine Pakebusch (blau) und aus dieser Arbeit (lila). Zudem sind die Inkubationstemperaturen sowie Länge und GC-Gehalt der Substrate aufgeführt.

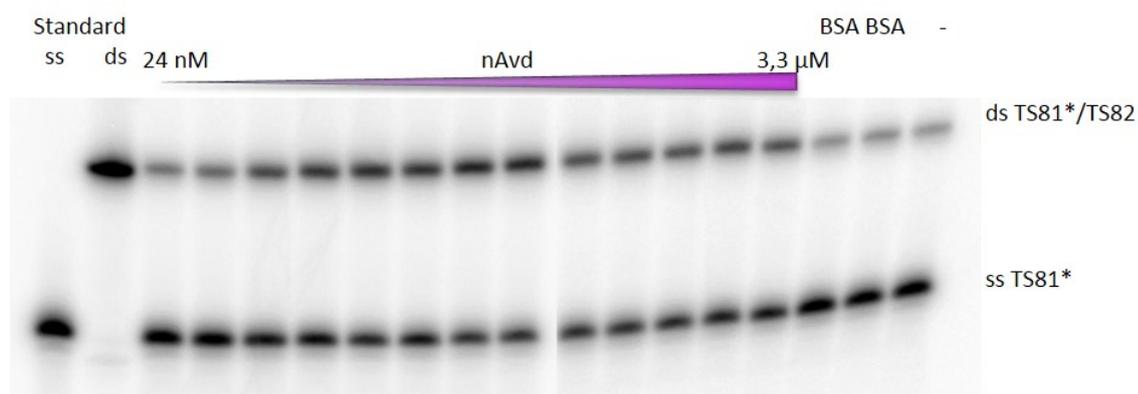
Substrat	Inkubations- temperatur	Kd-Werte [nM]	Länge	GC- Gehalt
ssDNA (kontextfremd)	RT	40-50	48 bp	33%
RNA/DNA-Hybrid (TR, mismatch)	0 °C	100	40 bp	50%
RNA/DNA-Hybrid (TR perfect match)	RT	<80	40 bp	50%
RNA/DNA-Hybrid (TR, perfect match)	0 °C	100-200	40 bp	50%
dsDNA (Haarnadelstruktur)	RT	110-120	74 bp	30 %
dsDNA (Haarnadelstruktur)	RT	100-200	74 bp	30 %
dsDNA (Kreuzstruktur)	RT	80	74 bp	34%
dsDNA (Kreuzstruktur)	RT	100-200	74 bp	34%
dsDNA (kontextfremd)	RT	300-400	48 bp	33%
dsDNA (kontextfremd)	RT	<200	48 bp	33%
TR-RNA	RT	300-400	-	-
RNA (kontextfremd)	RT	300	-	-

### III.III Hybridisierungsversuche der nAvd

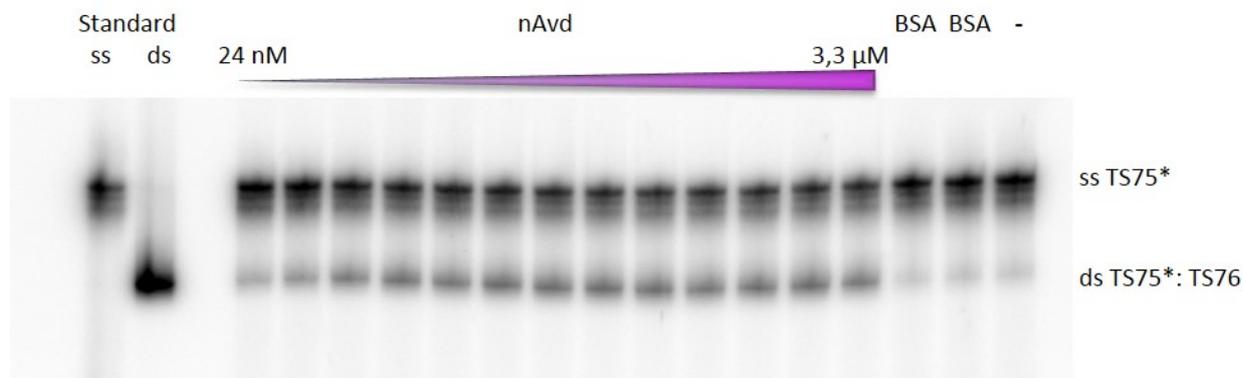
Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhafte Hybridisierungsassays der nAvd mit verschiedenen Substraten.



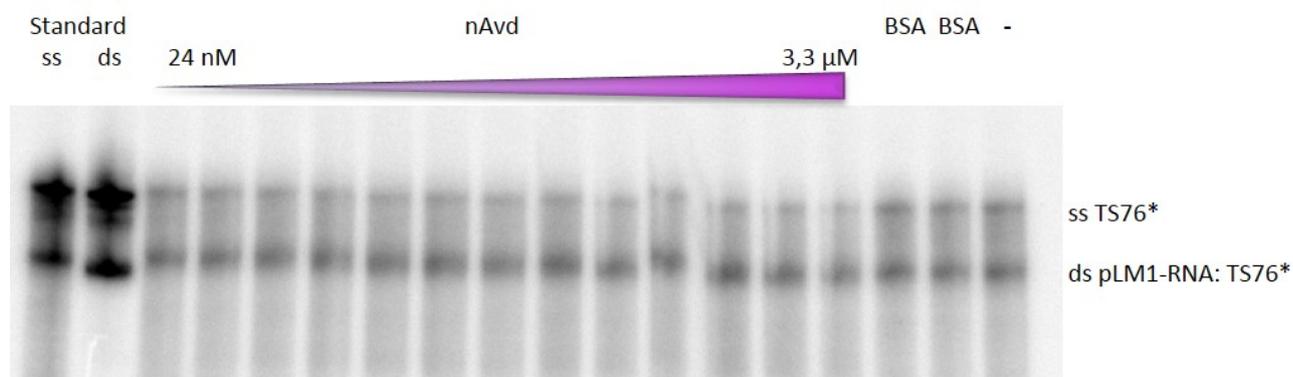
**Abbildung 35: Hybridisierungsassay mit NZ50\* und NZ51.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck werden die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ . Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$  und 3,3  $\mu\text{M}$ ) und kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die Einzelstränge befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd oder der Kontrollen gestartet und nach einer 2 minütigen Inkubation bei den 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Es ist eine nAvd abhängige Zunahme des Doppelstranganteils zu erkennen. In den Negativkontrollen liegt der Hauptteil der DNA einzelsträngig vor.



**Abbildung 36: Hybridisierungsassay mit TS81\* und TS82.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck werden die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ . Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$  und 3,3  $\mu\text{M}$ ) und kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die Einzelstränge befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd oder der Kontrollen gestartet und nach einer 2 minütigen Inkubation bei den 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Es ist eine nAvd abhängige Zunahme des Doppelstranganteils zu erkennen. In den Negativkontrollen liegt der Hauptteil der DNA einzelsträngig vor.



**Abbildung 37: Hybridisierungsassay mit TS75\* und TS76.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck werden die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ . Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$  und 3,3  $\mu\text{M}$ ) und kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die Einzelstränge befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd oder der Kontrollen gestartet und nach einer 2 minütigen Inkubation bei den 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Es ist eine nAvd abhängige Zunahme des Doppelstranganteils zu erkennen. In den Negativkontrollen liegt der Hauptteil der DNA einzelsträngig vor.



**Abbildung 38: Hybridisierungsassay mit pLM1-RNA und TS76\*.** Die Auftrennung erfolgte über 12 %ige native PAGE. Die radioaktiv markierten Banden ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ) wurden anschließend mittels Phosphorimaging und dem Cyclone System (GE Healthcare) visualisiert. Durch das lila Dreieck werden die aufsteigenden nAvd-Konzentrationen dargestellt: 24 nM, 74 nM, 222 nM, 444 nM, 666 nM, 999 nM, 1,3  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2,3  $\mu\text{M}$ , 2,6  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$ . Zur Kontrolle wurde das DNA-bindende Bovine Serum Albumin (BSA) (2  $\mu\text{M}$  und 3,3  $\mu\text{M}$ ) und kein Protein (Negativkontrolle -) anstelle der nAvd in die Reaktion eingesetzt. Die Einzelstränge befanden sich im Verhältnis 1:2 (1,8 nM\*:3,6 nM) in den Ansätzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der nAvd oder der Kontrollen gestartet und nach einer 2 minütigen Inkubation bei den 37 °C durch Zugabe von kaltem Stopp-Reagenz abgestoppt. Es ist eine nAvd abhängige Zunahme des Doppelstranganteils zu erkennen. In den Negativkontrollen liegt der Hauptteil der DNA einzelsträngig vor.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Dr. Nora Zingler für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Molekulare Genetik und natürlich für die Ermöglichung meiner Promotion bedanken. Die Zeit mit dir, war für mich die lehrreichste und konstruktivste Zeit überhaupt.

Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Hahn für die Erstellung des Zweitgutachtens und ebenso bei Herrn Professor Dr. Cullum für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Cullum für die Unterstützung während meiner Promotion.

Ich danke meinen Eltern für einfach alles. Es würde den Rahmen sprengen, alles aufzuzählen wofür ich euch dankbar bin. Ich danke meinem Ehemann, der mir während Studium und Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich während meiner Schwangerschaft und nach der Geburt unseres Sohnes stets unterstützt hat, sodass ich weiter an meiner Dissertation arbeiten konnte.

Natürlich danke ich meinen lieben Kollegen, die mir die Zeit im Labor, aber auch im privaten Rahmen sehr verschönert haben. Hierbei danke ich vor allem Dr. Thomas Schillinger, Dr. Philipp Möller und Maike Gieseke für die wunderbare Zusammenarbeit. Ebenso danke ich euch für die hilfreichen und konstruktiven Diskussionen und Anregungen. Zudem möchte ich mich bei Lisa Morgenstern, Christine Pakebusch und Katrin Haag für ihr Vertrauen in meine Betreuung und die tolle Zusammenarbeit bedanken. Meinen Freundinnen danke ich für den geistigen Austausch und die Ermutigungen nicht die Geduld zu verlieren.

## Lebenslauf

Lisa Jakobi, M.Sc.

### Hochschul- / Schulausbildung

01/2012- 09/2016

Promotion: TU Kaiserslautern, Abteilung Molekulare Genetik

04/2010- 12/2011

Master of BioSciences: TU Kaiserslautern

Abschlussarbeit: Protein expression and DNA nicking activity of the UnaL2 and LINE-1 endonucleases;

10/2006- 03/2010

Bachelor der Biowissenschaften: TU Kaiserslautern

Abschlussarbeit, extern an der Universität Heidelberg (IPMB): Phylogeny of *Accipitridae* in Africa based on the mitochondrial cyochrome b gene

08/1997- 07/2006

Allgemeine Hochschulreife: Geschwister-Scholl-Gymnasium, Mannheim

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Analyse und biochemische Charakterisierung der Protein-Komponenten eines Diversitätsgenerierenden Retroelements aus *Nostoc sp. PCC 7120*“ selbständig, ohne fremde Hilfe, und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe, und dass Entlehnungen aus Schriften, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Dissertation bisher an keinem anderen Fachbereich der Technischen Universität Kaiserslautern oder einer anderen Universität eingereicht wurde, und ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Kaiserslautern, den 09.12.16

Lisa Jakobi