
**Untersuchung der DNA-Reparaturwege
in *Corynebacterium glutamicum*
anhand von Deletionsmutanten**

von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Fabiola Kautzmann

geb. Dobler

aus Großaspach

Hauptberichter: Prof. Dr. Ralf Mattes

Mitberichter: PD Dr. Martin Siemann-Herzberg

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2018

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

2018

Meinen Eltern

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die von mir ausdrücklich genannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Übernommenes Gedankengut wurde von mir als solches kenntlich gemacht.

Fabiola Kautzmann

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Mattes für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Industrielle Genetik, die Korrektur meines Manuskriptes sowie die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn PD Dr. Martin Siemann-Herzberg vom Institut für Bioverfahrenstechnik danke ich für die Bereitschaft zur Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Josef Altenbuchner, der meine praktische Arbeit der letzten Jahre begleitet hat. Herr Dr. Altenbuchner hat mich durch viele hilfreiche Anregungen unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem bedanke ich mich für die Korrektur meines Manuskriptes.

Den Mitarbeitern des IIG danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie möchte ich herzlich für ihr Verständnis und die Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen	9
Zusammenfassung.....	12
Summary	15
1. Einleitung	17
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> (<i>C. glutamicum</i>)	17
1.2 Mutationen.....	18
1.2.1 Spontanmutationen	20
1.2.2 Induzierte Mutationen	21
1.3 DNA-Reparatur	26
1.3.1 Direkte Reparatur.....	27
1.3.2 Basenexzisionsreparatur	29
1.3.3 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	36
1.3.4 Homologe Rekombination (HR)	38
1.3.5 Reparatur von Basenfehlpaarungen (<i>Mismatch</i> -Reparatur, MMR)	49
1.4 Übersicht der vorgestellten Gene der DNA-Reparatur	49
1.5 Zielsetzung.....	51
2 Material und Methoden	53
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	53
2.1.1 Bakterienstämme	53
2.1.2 Plasmide	53
2.2 Materialien	55
2.2.1 Chemikalien.....	55

2.2.2	Enzyme	56
2.2.3	Kits	56
2.2.4	Oligonukleotide	57
2.2.5	Medien	62
2.2.6	Antibiotika und andere Medienzusätze	63
2.2.7	Puffer und Lösungen	64
2.3	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	68
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	68
2.3.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	68
2.4	Transformationsmethoden	69
2.4.1	Transformation von <i>E. coli</i>	69
2.4.2	Transformation von <i>C. glutamicum</i> (modifiziert nach Kirchner)	70
2.5	Molekulargenetische Methoden	71
2.5.1	Plasmidisolierung	71
2.5.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	72
2.5.3	PCR (Polymerase Chain Reaction)	73
2.5.4	Agarosegelelektrophorese	76
2.5.5	Reinigung von PCR-Fragmenten und DNA-Extraktion aus Agarosegelen	77
2.5.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	77
2.5.7	Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA	78
2.5.8	Isopropanolfällung	78
2.5.9	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	78
2.5.10	Behandlung mit Klenow-Enzym	79
2.5.11	Ligation	79
2.5.12	<i>Gibson Assembly</i> [®] bzw. <i>NEBuilder</i> [®]	79
2.5.13	Blau-Weiß-Test	80

2.5.14	DNA-Sequenzierung	80
2.5.15	Markerfreie chromosomale Deletionen in <i>C. glutamicum</i>	80
2.6	Proteinanalytik.....	82
2.6.1	Gen-Expression bei Vektoren mit Rhamnose- bzw. Arabinose-Promotor	82
2.6.2	Zellaufschluss und Herstellung von Protein-Rohextrakten.....	82
2.6.3	Benzonase-Behandlung.....	83
2.6.4	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	83
2.6.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	84
2.6.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	84
2.7	Enzymtests.....	86
2.7.1	Nachweis der Exonukleaseaktivität über Degradierung von DNA.....	86
2.7.2	Nachweis der Helikase-Aktivität	87
2.8	Mutagenese von <i>C. glutamicum</i>	87
2.8.1	UV-Mutagenese.....	87
2.8.2	Zeocin-Mutagenese.....	88
2.8.3	Mitomycin C-Mutagenese	88
2.8.4	MNNG-Mutagenese	89
3	Ergebnisse	90
3.1	Herstellung verschiedener Deletionsstämmen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	90
3.1.1	Deletion chromosomaler Gene	90
3.1.2	Konstruierte Deletionsstämmen	95
3.2	Methoden zur Mutagenese von <i>C. glutamicum</i>	103
3.2.1	UV-Mutagenese.....	103
3.2.2	Zeocin-Mutagenese.....	104
3.2.3	Mitomycin C-Mutagenese	105
3.2.4	MNNG-Mutagenese	106

3.3	Überlebensraten der Mutanten, die in der Direkten DNA-Reparatur betroffen sind ..	107
3.3.1	UV-Mutagenese.....	108
3.3.2	Zeocin-Mutagenese.....	109
3.3.3	Mitomycin-Mutagenese der DR-Mutanten	110
3.3.4	MNNG-Mutagenese der Mutanten FD4 und FD15	111
3.4	Auswirkungen der Deletion von Genen aus der Basenexzisionsreparatur.....	111
3.4.1	UV-Mutagenese.....	112
3.4.2	Zeocin-Mutagenese.....	114
3.4.3	Mitomycin C -Mutagenese	116
3.4.4	MNNG-Mutagenese	118
3.5	Auswirkung von Mutagenen auf <i>C. glutamicum</i> Stämme mit Mutationen in Genen der Nukleotidexzisionsreparatur	120
3.5.1	UV-Mutagenese.....	121
3.5.2	Zeocin-Mutagenese.....	122
3.5.3	Mitomycin C-Mutagenese	123
3.5.4	MNNG-Mutagenese	124
3.6	Auswirkung von Mutagenen auf Mutanten in Genen der Rekombinationsreparatur .	125
3.6.1	UV-Mutagenese.....	125
3.6.2	Zeocin-Mutagnese.....	127
3.6.3	Mitomycin C-Mutagenese	128
3.6.4	MNNG-Mutagenese	129
3.7	Charakterisierung der Aktivität von RecJ und RecB aus <i>C. glutamicum</i>	130
3.7.1	Heterologe Expression von <i>recJ</i>	131
3.7.2	Produktion von RecB	133

3.7.3	Untersuchung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB	134
4	Diskussion	150
4.1	Auswirkungen der Deletion von Genen der Direkten Reparatur auf die Überlebensfähigkeit nach Mutagenese	152
4.2	Folgen der Deletion verschiedener Gene aus der Basenexzisionsreparatur auf die Überlebensrate der Mutanten	155
4.3	Charakterisierung der Deletionsmutanten der Nukleotidexzisionsreparatur	160
4.4	Auswirkungen der Deletion verschiedener Gene aus der Rekombinationsreparatur auf die Überlebensraten der Stämme	161
4.5	Rolle von RecJ und RecB	167
4.6	Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick	174
5	Literaturverzeichnis	178
6	Abbildungsverzeichnis	206
7	Tabellenverzeichnis.....	208
8	Lebenslauf	210

Abkürzungen

3-MeA	3-Methyladenin
6,4-PP	6,4-Photoprodukt
8-OxoG	8-Oxo-7,8-Dihydroguanin
A	Adenin
Amp (<i>bla</i>)	Ampicillin (Resistenzgen)
AP-Stelle	abasische Stelle (engl.: <i>apurinic/apyrimidinic site</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
ca.	circa
Cm (<i>cat</i>)	Chloramphenicol (Resistenzgen)
CPD	Cyklisches Pyrimidindimer
Δ (Delta)	Deletion
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP(s)	Desoxy-Nukleotidtriphosphat(e)
DR	Direkte Reparatur
ds	doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>engl.</i>	<i>englisch</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)

FaPy	Formamidopyrimidin
G	Guanin
GRAS	<i>generally regarded as save</i>
<i>griech.</i>	<i>griechisch</i>
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure
HR	Homologe Rekombination
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
J	Joule
kb	Kilobasen (1.000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (1.000 Dalton)
Km (<i>aph-3</i>)	Kanamycin (Resistenzgen)
LB _x (-Medium)	<i>Lysogeny Broth</i> (Medium) mit Antibiotikum X
Mio	Millionen
MMC	Mitomycin C
MMR	Methylierungsabhängige <i>mismatch</i> Reparatur
MNG	Mononatriumglutamat
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
N	Stickstoff
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte bei x nm
<i>ORF</i>	<i>Open Reading Frame</i>
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reverse-Primer</i>

rpm	<i>rotations per minute</i>
RR	Rekombinationsreparatur
RT	Raumtemperatur (ca. 20 °C)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Polyacrylamidgelelektrophorese
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
T	Thymin
t	Tonnen
TAE	TRIS/Acetat/EDTA
TBE	TRIS/Borsäure/EDTA
TE	TRIS/EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSL	Tochterstranglücke, Einzelstranglücke
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
TY	Trypton / <i>Yeast</i> (= Hefeextrakt)
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die Prozesse der DNA-Reparatur in *C. glutamicum* zu erhalten. Hierzu wurden zunächst Mutanten von *C. glutamicum* hergestellt, bei denen ein oder mehrere Gene eines Reparaturweges deletiert wurden. Dabei entstanden 23 verschiedene Deletionsmutanten. Mittels UV-Licht, Zeocin, Mitomycin C und N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) wurden die Überlebensraten der verschiedenen Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm ATCC 13032 von *C. glutamicum* bestimmt.

Zur Untersuchung der Direkten Reparatur wurden die Oxidative Demethylase AlkB und die Methyltransferase Ogt entfernt. Während die Deletion von *alkB* zu einer Verbesserung der Überlebensraten nach der Behandlung mit UV-Licht und Mitomycin C führte, zeigte die *ogt*-Mutante bei diesen Mutagenesen keine signifikante Abweichung zum Referenzstamm ATCC 13032. Auch im Fall der Zeocin-Mutagenese konnte keine Beteiligung von Ogt an der Reparatur dieser Schäden beobachtet werden. Wurde *alkB* deletiert, war jedoch ein verringertes Überleben der Zellen erkennbar. Nach der Behandlung mit MNNG zeigte sich, dass die Deletion von *alkB* keine veränderten Überlebensraten hervorbrachte. Der *ogt*-Stamm hingegen war wiederum deutlich empfindlicher gegenüber MNNG.

Muss eine geschädigte Base aus der DNA wieder entfernt werden, kommt die Basenexzisionsreparatur zum Einsatz. Insgesamt wurden 11 verschiedene Mutanten dieses Reparaturweges hergestellt. Es wurden die Gene der DNA-Glykosylasen Ung, MutM, TagI, AlkA und MutY deletiert. Außerdem wurden die Gene für die Endonukleasen Nei und Nth und für die Exonuklease Xth aus dem Genom entfernt. Zusätzlich entstanden Mehrfachmutanten, bei welchen mehrere Gene aufgrund ihrer ähnlichen Substrate oder Wirkungsweisen gleichzeitig deletiert wurden. Auf die Reparatur von Schäden, die durch UV-Strahlung oder Zeocin verursacht werden, hatten die verschiedenen Deletionen keinen Einfluss. Wurden die Stämme mit Mitomycin C behandelt, zeigte sich jedoch, dass die Deletion der Endonuklease-Gene *nei* und *nth* einen negativen Effekt auf das Überleben hatte. Nach der Behandlung mit MNNG wurde deutlich, dass die Deletion der DNA-Glycosylase-Gene zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber diesem Mutagen führte. Die deutlichsten Abweichungen zeigten die Mutanten ohne *tagI*. Auch die Endonukleasen scheinen essentiell für die Reparatur dieser Schäden zu sein. Vor allem die gleichzeitige Deletion von *nei* und *nth* hatte einen starken negativen Effekt auf die Überlebensraten der Mutanten.

Die Nukleotidexzisionsreparatur ist zuständig für Läsionen, die die Struktur der DNA verändern. Aus diesem Reparaturweg wurden die DNA-Helikase UvrD und die ATPase UvrA entfernt. Die Mutanten dieses Reparaturweges zeigten eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung und Zeocin. Auf Mitomycin C reagierte die *uvrA*-Mutante ebenfalls sehr sensitiv. Behandelte man die Deletionsstämme der Nukleotidexzisionsreparatur mit MNNG, zeigte sich interessanterweise, dass die Deletion von *uvrA* das Überleben im Vergleich zum Wildtyp begünstigte. Die Deletion von *uvrD* hatte wiederum einen negativen Effekt.

Sind beide DNA-Stränge von einem Schaden betroffen, so dass ein Strangaustausch erforderlich wird, kommen Enzyme zum Einsatz, die die Homologe Rekombination ermöglichen. Aus der Rekombinationsreparatur wurden die Gene für die Rekombinase RecA, die Exonuklease RecJ, die Helikase RuvB, die Helikase RecG und die Helikasen/Exonukleasen RecB bzw. AdnAB deletiert. Außerdem wurde das Gen für RecO deletiert, welches an einzelsträngige DNA binden und RecA an diese heranführen kann. Zusätzlich zu den Einzelmutanten, wurden *recB* und *adnAB* gleichzeitig deletiert. Die Deletion des Gens für die Rekombinase RecA führte in allen Fällen zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den eingesetzten Mutagenen. Nach der Behandlung mit UV-Strahlung zeigten auch die *ruvB*-Mutante und die *recO*-Mutante eine deutlich verringerte Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032. Die Behandlung der Stämme mit Zeocin verursachte bei dem Deletionsstamm $\Delta recJ$ überraschenderweise eine Unempfindlichkeit gegenüber diesem Mutagen. Alle anderen Mutanten der Homologen Rekombination reagierten wiederum sensitiver als der Ausgangsstamm ATCC 13032. Wurden die Zellen mit Mitomycin C behandelt, zeigte sich, dass die Deletion von *recJ* bzw. *recB* den geringsten Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte. Im Falle der Behandlung mit MNNG wurde die Rolle der Homologen Rekombination bei der Reparatur von Schäden dieser Art ebenfalls deutlich. Alle Deletionsstämme dieses Reparaturweges reagierten signifikant empfindlicher gegenüber MNNG.

Aufgrund der teilweise doch überraschenden Ergebnisse, wurde die genaue Funktion von RecJ und RecB aus *C. glutamicum* weiter untersucht. Hierbei konnten Rückschlüsse auf die Aktivität der beiden Enzyme gezogen werden. So deuteten die Untersuchungen darauf hin, dass es sich bei RecJ um eine Exonuklease mit 5'-3'-Aktivität handelte, die sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA abbauen kann. Außerdem könnte RecJ zusätzlich über

Endonukleaseaktivität verfügen. Offensichtlich ist die 3'-5'-Exonuklease RecB durch ihre integrierte Helikaseaktivität in der Lage doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufzubrechen und anschließend abzubauen.

Bezüglich seiner Genausstattung und Funktion der DNA-Reparatur zeigt *Corynebacterium glutamicum* viele Gemeinsamkeiten mit den gut untersuchten Modellorganismen wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans* und *Mycobacterium* sp..

Summary

The aim of this study was to understand the processes of DNA repair in *C. glutamicum*. For this purpose, mutants of *C. glutamicum* with one or more gene deletions in their DNA repair pathway were created. In this way, 23 different deletion mutants were constructed. By using UV light, Zeocin, Mitomycin C and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) mutagens, the survival rates of the mutants were determined in comparison with the wild type strain, *C. glutamicum* ATCC 13032.

To investigate the direct repair, encoding genes of oxidative demethylase AlkB and methyltransferase Ogt were deleted. While deletion of *alkB* resulted in an enhanced survival rate after treatment with UV light and mitomycin C, the Δogt mutant did not show a significant difference to the reference strain ATCC 13032. Likewise, Ogt does not participate in repairing damages caused by Zeocin. However, when *alkB* was deleted, a reduced survival rate of the cells was observed. Deletion of *alkB* did not change the survival rate of the cells after treatment with MNNG. In contrast, the Δogt mutant strain was significantly more sensitive towards MNNG.

When a damaged base must be removed from the DNA, the base excision repair (BER) pathway becomes operational. In total, 11 mutants of the BER pathway were created by deletion of the DNA glycosylases Ung, MutM, TagI, AlkA, and MutY encoding genes. Furthermore, the genes encoding endonucleases Nei and Nth as well as the exonuclease Xth were removed from the genome. Additionally, strains with multiple mutations in two or three genes due to their similar substrates or function were created. The repair of damages caused by UV light or Zeocin was not influenced by most of deletions. However, deletion of the endonucleases Nei and Nth encoding genes showed a negative effect towards the survival rate of the cells after treatment with Mitomycin C. It also became clear that deletion of the DNA glycosylases encoding genes resulted in an altered sensitivity towards MNNG. In this case, deletion of *tagI* had the major impact. Likewise, the endonucleases seemed to be essential for the repair of MNNG damages. Especially, deletion of *nei* together with *nth* had a severe negative effect on the survival of the mutant strain.

The nucleotide excision repair (NER) is responsible for the repair of lesions that change the structure of the DNA. From this repair pathway, the DNA helicase UvrD and the ATPase UvrA encoding genes were deleted. Mutation of this repair pathway indicated a significant increase

in the sensitivity towards UV radiation and Zeocin. The $\Delta uvrA$ mutant was also reacting highly sensitive towards Mitomycin C. When the NER deletion mutants were treated with MNNG, it interestingly showed that the survival rate of the *uvrA* mutant was promoted compared to the wild type. On the other hand, deletion of *uvrD* had a negative effect.

When both strands of the DNA are damaged in a way that the strand exchange is vital, the enzymes enabling the homologous recombination become operational. From the repair system by homologous recombination, the genes encoding the recombinase RecA, the exonuclease RecJ, the helicases, RuvB and RecG, and the helicases/nucleases, RecB and AdnAB, were deleted. Besides, the coding sequence of RecO was deleted, which binds to the single stranded DNA and mediates the binding of RecA to DNA. In addition to single deletion mutants, *recB* and *adnAB* were together deleted. In all cases, deletion of *recA* resulted in an increased sensitivity of the cells to the used mutagens. After treatment with UV light, the $\Delta recO$ and the $\Delta ruvB$ mutants showed a significantly reduced survival rate in comparison with the wild type strain ATCC 13032. Surprisingly, treatment of the strains with Zeocin indicated that the $\Delta recJ$ mutant was not sensitive against this mutagen. On the contrary, all other mutants showed a reduction in their survival rate compared to the wild type ATCC 13032. When the cells were treated with Mitomycin C, it was shown that deletion of *recJ* and *recB* had the weakest effect on the survival rate of the cells. In the case of treatment with MNNG, the role of the homologous recombination in the repair of damages of this kind became clear. All the mutants of this repair pathway dramatically became more sensitive to MNNG.

Due to the unexpected results, the exact function of RecJ and RecB was further investigated. In this way, the exact activity of these two enzymes became apparent. These experiments revealed that RecJ is an exonuclease with 5' to 3' activity which is able to degrade both double and single stranded DNA. Likewise, RecJ likely possesses a distinct endonuclease activity. Through its integrated helicase activity, the 3' to 5' exonuclease RecB is capable of separation of the double stranded DNA to single stranded DNA and its final degradation.

In terms of gene structure and function, the DNA repair pathways of *C. glutamicum* is highly similar to other intensively investigated model organisms, such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium sp.*

1. Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*)

Bereits seit etwa 60 Jahren spielt *C. glutamicum* eine große Rolle in der Biotechnologie. Heute gehört dieser Mikroorganismus zu den wichtigsten industriell genutzten Produktionsstämmen für Aminosäuren. Vor allem aufgrund seiner Fähigkeit zur günstigen Produktion großer Mengen Mononatriumglutamat aus Zuckern wird *C. glutamicum* in der Industrie eingesetzt.

1908 identifizierte Kikunae Ikeda, ein Professor der Universität Tokyo, Mononatriumglutamat (MNG) als Hauptgeschmackskomponente der *konbu* Alge. Diese in der japanischen Küche sehr häufig eingesetzte Zutat zeichnet sich durch einen starken Eigengeschmack aus, weshalb dessen Inhaltsstoffe genau untersucht wurden (Ikeda 2002). Der als *umami* bezeichnete Geschmack gilt seither neben süß, sauer, salzig und bitter als fünfte Geschmacksqualität. Die Produktion von MNG erfolgte zunächst über saure Hydrolyse von Soja, Weizen und anderen pflanzlichen Proteinquellen. Die hohen Produktionskosten und der steigende Bedarf führten jedoch schnell dazu, dass nach weiteren Möglichkeiten zur Glutamat-Produktion geforscht wurde. Im Jahr 1956 wurde ein Programm begonnen, bei dem nach Mikroorganismen gesucht wurde, die extrazellulär Glutaminsäure akkumulieren. Ein Jahr später konnte aus Bodenproben ein Bakterium isoliert werden, welches unter Biotinmangel L-Glutamat bildete (Kinoshita *et al.* 1957; Abe *et al.* 1967). Seither war die kommerzielle Produktion von Aminosäuren mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* möglich (Kumagai 2000). Weltweit werden mittlerweile 3 Millionen Tonnen L-Glutamat und weitere 1,9 Mio t L-Lysin mit Hilfe von *C. glutamicum* hergestellt. Ein jährliches Marktwachstum von ca. 10 % erfordert eine ständig betriebene Stamm- und Prozessentwicklung. In Form seines Natriumsalzes findet L-Glutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie Verwendung. L-Lysin kommt vorwiegend als Futtermittelzusatz in der Viehhaltung oder als Grundstoff in der Kosmetikindustrie zum Einsatz. Außerdem werden mit Hilfe von *C. glutamicum* weitere Aminosäuren, wie zum Beispiel L-Valin und L-Isoleucin produziert (Kalinowski *et al.* 2003).

C. glutamicum ist unbeweglich, nicht sporulierend und zeichnet sich durch eine unregelmäßige stäbchen- bis keulenförmige Morphologie (Abbildung 1) aus, welche namensgebend ist (*griech.*: *coryne* = Keule).

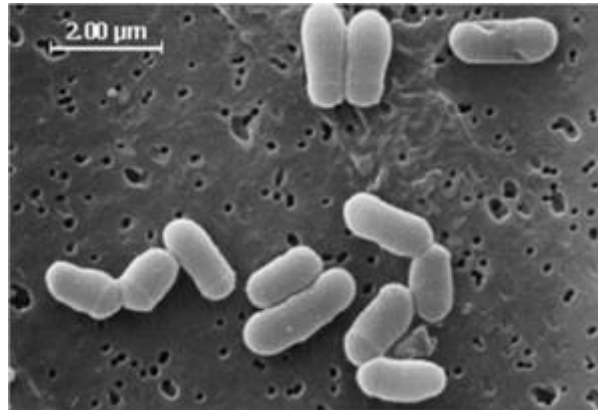


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*
[bacmap.wishartlab.com]

Das Gram-positive Bakterium gehört zur Klasse der *Actinobacteria* und weist einen etwas höheren GC-Gehalt in seinem Genom auf (53,8 %). Weitere Mitglieder der zugehörigen Mycolsäure-bildenden Unterordnung *Corynebacteriaceae* sind *Corynebacterium diphtheriae* und die Arten *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Obwohl diese nahen Verwandten äußerst pathogen sind, wird *C. glutamicum* als „GRAS“-Organismus („generally regarded as safe“) eingestuft. Die große industrielle Bedeutung von *C. glutamicum* führte dazu, dass die Forschung an diesem Bakterium in den letzten Jahren stark vorangetrieben wurde. Umfangreiche Analysen zur Biochemie, Physiologie, Genetik und zum zentralen Aminosäurestoffwechsel dieses Bakteriums brachten bereits viele Erkenntnisse (Eggeling und Bott 2015). Zur ständigen Verbesserung und Weiterentwicklung dieses Organismus ist auch ein umfangreiches Wissen über die Mechanismen der DNA-Reparatur interessant.

1.2 Mutationen

Die genomische Integrität eines Organismus ist fortwährend chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt. Hierbei entstehen Schäden in der DNA. Werden diese Veränderungen nicht durch ein DNA-Reparatursystem erkannt und behoben, entstehen bleibende Mutationen, die zum Zelltod führen können.

Spontane Schädigung, z.B. durch eine fehlerhafte Replikation oder Reaktionen mit Intermediaten des normalen Zellstoffwechsels (Rydberg und Lindahl 1982), kann die DNA ebenso schädigen wie beispielsweise die spontane Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung

von Purinbasen (Lindahl und Nyberg 1972). Exogene Einflüsse, wie verschiedene Agenzien oder energetische Strahlung sind ebenfalls ursächlich für Schäden. Auf molekularer Ebene können verschiedene Arten von DNA-Schäden unterschieden werden. Es handelt sich entweder um räumlich kleine DNA-Modifizierungen, die sich nicht auf die Struktur der Doppelhelix auswirken oder räumlich große DNA-Modifizierungen, die die dreidimensionale Struktur der Doppelhelix verändern sowie DNA-Strangbrüche.

Manifestiert sich eine DNA-Schädigung im Genom, führt dies zu einer Mutation. Es gibt verschiedene Arten von Mutationen. Bei einer Punktmutation kommt es zur Veränderung einer einzelnen Base. Wird hierbei eine Purin-Base durch die andere Purin-Base bzw. eine Pyrimidin-Base durch die andere Pyrimidin-Base ausgetauscht, spricht man von einer Transition. Verändert sich der Charakter der ursprünglichen Base (Austausch von Purin- und Pyrimidin-Base), handelt es sich um eine Transversion. Durch diese Modifikationen kann sich dann auch die Abfolge der Aminosäuren des codierten Proteins verändern und somit ein fehlerhaftes Produkt bei der Translation entstehen. Durch die Degeneration des genetischen Codes kann eine solche Punktmutation an der dritten Stelle eines Codons auch die ursprüngliche Aminosäure beibehalten. In diesem Fall spricht man von einer „stillen Mutation“. Kommt es in Folge der Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure handelt es sich um eine „*Missense Mutation*“ da der eigentliche Sinn der DNA-Information in diesem Bereich verloren ging. Führt die Punktmutation dazu, dass an falscher Stelle ein Stopcodon entsteht, wird die Translation vorzeitig abgebrochen wodurch ein unvollständiges, meist funktionsunfähiges Protein entsteht. Bei dieser Art der Mutation spricht man von einer „*Nonsense Mutation*“. Der Einbau (Insertion) bzw. die Deletion einer einzelnen Base wiederum führt zu einer Rastermutation. Hierbei wird der Leserahmen eines Gens verschoben (*engl.: frameshift*), wodurch ebenfalls ein fehlerhaftes Protein gebildet wird.

Auch ganze Chromosomenabschnitte können von einer Mutation betroffen sein. Geht ein Teil des Chromosoms verloren handelt es sich um eine Deletion. Bei einer Inversion wird ein Bereich der DNA umgedreht (invertiert). Werden ganze Chromosomenabschnitte an eine andere Position verlagert, spricht man von einer Translokation. Im Extremfall kann sich in Eukaryonten hierbei ein ganzes Chromosom an ein anderes anlagern.

1.2.1 Spontanmutationen

Mutationen ohne äußere Ursache bezeichnet man als Spontane Mutationen. Sie entstehen oftmals durch die chemische Modifikation einer Base oder einem Fehler bei der Replikation.

Die Struktur der Basen ist nicht stabil, so dass es gelegentlich zu Umlagerungen kommt und die Basen andere Eigenschaften annehmen. Die Milieubedingungen der Zellen, wie z.B. die Temperatur, bestimmen in welcher Form die Basen vorliegen. Dabei können Guanin und Thymin anstatt in der normalen Ketoform auch in der Enolform vorhanden sein (Singer und Kusmirek 1982). Durch die Verschiebung eines H-Atoms und einer Doppelbindung ändert sich das Basenpaarungsverhalten so, dass Guanin (G) mit Thymin (T) und T mit G paart. Auch bei Adenin (A) und Cytosin (C) gibt es diese Tautomerie. Während diese beiden Basen meist in der Aminoform auftreten, können sie in seltenen Fällen auch in der Iminoform vorliegen. In Folge dieser Umlagerung kommt es zur Paarung von A mit C.

Auch eine spontane Desaminierung führt zu Basen-Fehlpaarungen. Wird C desaminiert, entsteht Uracil (U). Diese Reaktion hat eine Transition zur Folge. Aus G-U wird A-T. Außerdem führt die Desaminierung von A zur Bildung von Hypoxanthin (A-T wird zu G-C). Wird 5-Methyl-C desaminiert, entsteht T (C-G wird zu T-A) (Lindahl 1979, 1993). Die hydrolytische Depurinierung ist ebenfalls ein Beispiel für die spontane Entstehung von Mutationen. Hier wird die glykosidische Bindung zwischen einer Purinbase und dem Desoxyribosegerüst gespalten, während das Zucker-Phosphat-Gerüst intakt bleibt. Es entsteht eine sog. Apurinstelle. Auch Apyrimidinstellen können spontan entstehen. Diese sind meist eine Folge der Desaminierung von Cytosinresten.

Bei vielen Prozessen in der Zelle entstehen Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese lösen immer wieder Beschädigungen in der DNA aus. Aufgrund ihres hohen Redoxpotentials stellen sie eine Hauptquelle endogener Schäden dar (Imay und Linn 1988; Ames und Gold 1991). Sie schädigen die DNA auf vielfältige Weise. Zum Beispiel können durch die ROS sowohl Einzelstrang- als auch Doppelstrangbrüche generiert werden (Halliwell und Aruoma 1991; Hoffmann und Meneghini 1979). Außerdem führt u. a. die Oxidation von T zu Thyminglykol zum Abbruch der Replikation an dieser Stelle (Clark und Beardsley 1986, 1987). Eine Oxidation von G zu 8-Oxo-Guanin (Cadet *et al.* 1999) ermöglicht häufig eine Fehlpaarung mit A (Neeley und Essigmann 2006).

Wenn während des Replikationsvorgangs selbst ein Fehler gemacht wird, kann dies in der Entfernung (Deletion) oder Verdopplung (Duplikation) einzelner oder mehrerer Basen resultieren. Dies tritt bevorzugt bei der Replikation repetitiver Sequenzen auf. Durch ein Stottern bzw. Rutschen der DNA-Polymerase oder eine falsche Paarung der DNA-Stränge nach der Replikation, kann es hier zu Fehlpaarungen kommen (*Slippage Replikation*) (Kunkel 1993; Streisinger *et al.* 1966).

Meist werden diese DNA-Läsionen von den verschiedenen Reparatursystemen (siehe Kapitel 1.3) erkannt und behoben, bevor sie sich als bleibende Mutationen manifestieren. Ein Reparaturmechanismus für Insertionen und Deletionen existiert allerdings nicht.

1.2.2 Induzierte Mutationen

Nicht nur die zufälligen, spontan auftretenden Schäden können Mutationen auslösen. Auch durch Mutagene oder ionisierende Strahlung kann die DNA dauerhaft geschädigt werden. Die natürliche Strahlenbelastung eines Organismus beruht auf dem UV-Anteil des Sonnenlichts und der kosmischen Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht. Hinzu kommt noch die radioaktive Strahlung, die im Erdboden vorkommt. Die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung beinhaltet Anregungen bzw. Ionisationen in der Zelle. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen mit der DNA als Angriffspunkt. Man kann zwischen der direkten und indirekten Strahlenwirkung unterscheiden (Goodhead 1994; Nikjoo *et al.* 1997). Hochenergetische Teilchenstrahlung führt direkt zu chemischen Veränderungen biologischer Materie, wie z.B. dem Aufbrechen kovalenter Bindungen des DNA-Strangs. Die indirekte Strahlenwirkung, wie bei Röntgen- oder Gammastrahlung, beruht hingegen auf chemischen Sekundärprozessen, wobei durch die Absorption der Strahlung in direkter Nähe der DNA Schädigungen ausgelöst werden. Wassermoleküle sind dabei die häufigsten Reaktionspartner der energiereichen Strahlung. Hier entstehen Hydroxylradikale, die chemische Veränderungen und damit Schäden in der DNA verursachen (Chatgililoglu und O'Neill 2001). Diese strahlungsinduzierten Läsionen beinhalten Doppel- und Einzelstrangbrüche, Basenschäden und Quervernetzungen (*Crosslinks*) der DNA.

Die elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von etwa 260 bis 315 nm führt außerdem zur Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren. In einer photochemischen

Reaktion gehen hierbei zwei benachbarte T-Basen eine Verbindung ein, wodurch die Struktur der DNA gestört wird.

1.2.2.1 UV-Strahlung

Ultraviolette Strahlung umfasst Wellenlängen von 100 bis 380 nm. Bei der UV-C-Strahlung handelt es sich um die schädlichste Strahlung. Diese wird durch die Ozonschicht absorbiert. UV-B erreicht die Erdoberfläche und wird von der DNA lebender Organismen absorbiert. In Abbildung 2 ist das gesamte Spektrum der elektromagnetischen Strahlung dargestellt.

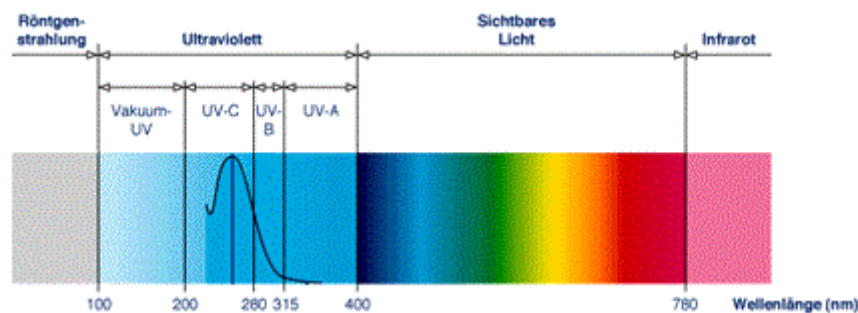


Abbildung 2: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung

modifiziert nach [<http://peschl-ultraviolet.com/deutsch/ueber-uv/was-ist-uv-strahlung/was-ist-uv-strahlung.html>]

UV-Strahlung kann die DNA direkt und indirekt schädigen. Direkte Schäden werden durch die Absorption von Photonen ausgelöst. Im Gegensatz dazu, resultieren indirekte Schäden aus chemischen Reaktionen der DNA mit Edukten, die durch UV-Strahlung entstanden sind (Friedberg 2006).

Die indirekte Wirkung von UV-Strahlen beruht auf der Ionisierung von Wassermolekülen, wodurch wiederum Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können. ROS sind hoch reaktiv und können nahezu alle biologisch wichtigen Moleküle, wie auch die DNA, schädigen. Bei der Entstehung eines elektrophilen Hydroxylradikals in direkter Umgebung der DNA, kann diese auf zwei Arten geschädigt werden. Zum einen kann es zu einer Addition an die Doppelbindungen der Basen kommen und zum anderen können Wasserstoffatome von den Zuckern des Rückgrats abgezogen werden (Breen und Murphy 1995). Letzteres führt wiederum entweder zu Strangbrüchen (Rhaese und Freese 1968; Cadet *et al.* 2005) oder zur

Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und einer daraus resultierenden abasischen Stelle (AP-Stelle) (Povirk und Steighner 1989). Aus der Oxidation von DNA-Basen entstehen vielerlei Produkte. Bjelland und Seeberg (2003) haben in ihrer Arbeit 80 bekannte Basenschädigungen durch Oxidation beschrieben. Als eines der Hauptprodukte der UV-bedingten Oxidation gilt 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-OxoG) (Kasai und Nishimura 1984). 8-OxoG kann eine Basenpaarung mit A eingehen und führt während der Replikation zur Transversion von C nach A (Shibutani *et al.* 1991).

Der direkte Wirkmechanismus von UV-Strahlung beruht auf der photochemischen Aktivierung der DNA. Neben weniger bedeutenden Nebenprodukten gelten das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) und das 6,4-Photoprodukt (6,4-PP) als die Hauptprodukte. Pyrimidindimere entstehen nach UV-Anregung des π -Elektronensystems zwischen dem C5 und dem C6 des Pyrimidins. Zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen kommt es zur kovalenten Bindung und folglich zu einer sog. Cycloaddition, die die beiden Pyrimidine mit einem Cyclobutanring verbindet. So entsteht ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer. Die Ausbildung einer Bindung zwischen der C6-Position des 5'-Pyrimidins und dem C4 des 3'-Pyrimidins, dem 6,4-PP, ist hingegen eher selten. Die Bildung von CPDs wird im Vergleich dazu bevorzugt (Friedberg 2006). In der folgenden Abbildung (Abbildung 3) sind die häufigsten DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung nochmals in ihrer Entstehung und Struktur dargestellt.

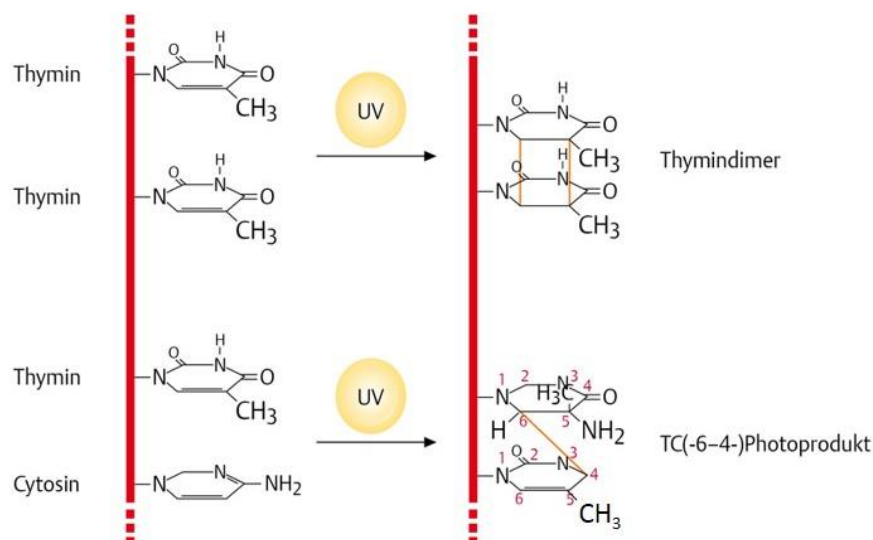


Abbildung 3: DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung

[Murken, Grimm, Holinski-Feder Humangenetik, Thieme, 2006]

1.2.2.2 Zeocin

Zeocin (siehe Abbildung 4) ist ein kupferchelatisierendes Glykopeptidantibiotikum und wird aus einer Mutante von *Streptomyces verticillus* isoliert (Bérdy, 1980). Bei Zeocin handelt es sich um einen Vertreter aus der Phleomycin-/Bleomycin Familie. Es besitzt ein weites Spektrum an Zielorganismen und wirkt sowohl gegen Bakterien als auch gegen Säugetiere, Pflanzen und Pilze. Die Wirkung dieses Antibiotikums liegt in der Fähigkeit DNA zu fragmentieren. Zeocin wird in der Zelle aktiviert, indem zunächst das Kupferion reduziert und dann entfernt wird. Durch die Bindung seines aminoterminalen Peptids und Einschlebung in die DNA werden freie Radikale gebildet, welche wiederum zur Spaltung der DNA führen.

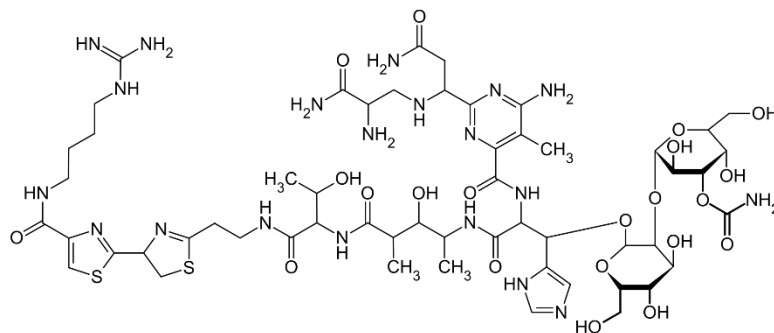


Abbildung 4: Strukturformel von Zeocin

[https://de.wikipedia.org/wiki/Phleomycin_D1]

1.2.2.3 Mitomycin C

Mitomycin C (MMC) hat eine antibiotische Wirkung auf Gram-positive Bakterien und wurde 1958 aus *Streptomyces caespitosus* isoliert (Wakaki et al. 1958). Nachdem MMC in der Zelle zunächst enzymatisch reduziert wird, reagiert es mit der DNA, indem es kovalent an Deoxyguanosin (dG) bindet. In Folge dessen entstehen an nebeneinander- bzw. gegenüberliegenden Guaninbasen inter- bzw. intrastranguläre Querverbindungen. Vor allem die Querverbindungen zwischen zwei Strängen können dazu führen, dass die Replikation effektiv blockiert wird (Borowy-Borowski et al. 1990; Weng et al. 2010; Bizanek et al. 1992). Die chemische Strukturformel dieses Mutagens ist in Abbildung 5 dargestellt.

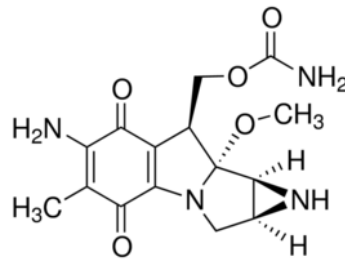


Abbildung 5: Struktur von Mitomycin C

[<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m4287?lang=de®ion=DE>]

1.2.2.4 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

Das alkylierende Agenz MNNG induziert primär die Bildung von 7-Methylguanin (Lawley und Thatcher 1970). Weiterhin wird unter anderem 3-Methylthymin gebildet. Diese alkylierten Basen sind als DNA-Baustein instabil und hinterlassen eine AP-Stelle (Lindahl und Ljungquist 1975). Auch die Bildung von O⁶-Alkylguanin führt zu Läsionen, die Mutationen nach sich ziehen. Die Basenfehlpaarung wird durch die Bindung von O⁶-Alkylguanin-Addukten mit Thymin während der Replikation verursacht (Kohalmi *et al.* 1993). Ebenso ist die Bildung von O⁴-Methylthymin ursächlich für T-A- zu C-G-Transitionen (Abbildung 6).

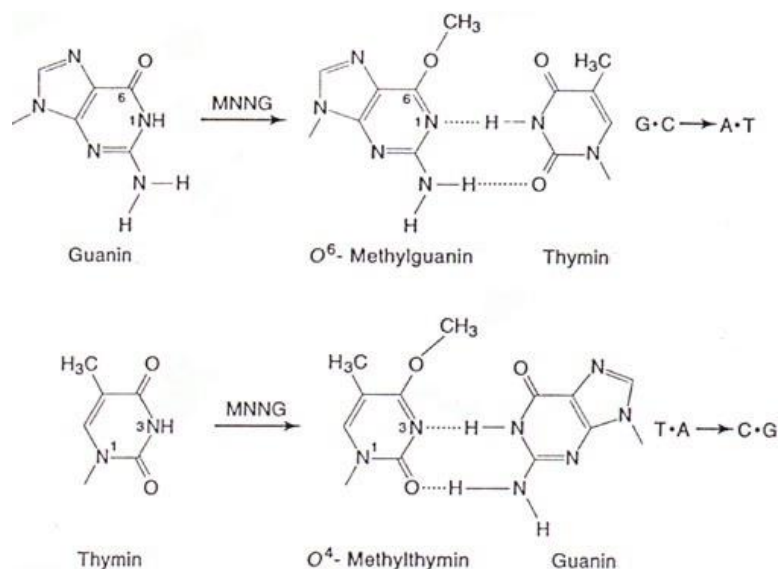


Abbildung 6: DNA-Schädigungen durch MNNG

[http://utminers.utep.edu/rwebb/html/mutagenesis__chemical.html]

1.3 DNA-Reparatur

Die Weitergabe genetischer Information ist ein sehr akkurater, aber nie ganz fehlerfreier Vorgang. Um die Unversehrtheit der genetischen Information zu wahren, müssen DNA-Schäden repariert werden. Die Fähigkeit, Mutationsraten, d. h. die Anzahl an Veränderungen der genetischen Information im Zeitraum einer Zellteilungsphase zu kontrollieren, ist eine herausragende Leistung jeder einzelnen Zelle. Durch einen weitestgehend genauen Mechanismus der Replikation und das Vorhandensein von Reparatursystemen werden auftretende Läsionen beseitigt. Wie in 1.2 bereits beschrieben, können primäre DNA-Schäden zu vererbaren DNA-Veränderungen führen. Ziel der DNA-Reparatur ist es diese Primär-Schäden vor ihrer Manifestation im Genom zu beseitigen und somit Mutationen zu vermeiden. Die fehlerfreie DNA-Reparatur ist folglich eine Voraussetzung für die Überlebensfähigkeit einer jeden Zelle. Viele Reparaturmechanismen haben sich sehr früh in der Evolution entwickelt und laufen in Organismen unterschiedlicher Evolutionsstufen ähnlich ab. Auch die Sequenzhomologien der beteiligten Proteine weisen auf einen gemeinsamen Ursprung hin. Zum Thema DNA-Reparatur gibt es zahllose Veröffentlichungen. Diese befassen sich allerdings vorwiegend mit den Vorgängen im Modellorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*). Die einfache Handhabung und gute Kultivierbarkeit machen dieses Bakterium zu einem beliebten Modellsystem in der molekularen Biologie und Biotechnologie. Durch seinen haploiden Chromosomensatz wirken sich einzelne Mutationen direkt auf den Phänotyp aus. Außerdem ist *E. coli* seit langem vollständig sequenziert und genetisch sehr gut zugänglich, da die molekularbiologischen Methoden, wie Transformation, Transduktion und Konjugation für diesen Organismus sehr gut etabliert sind. Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Reparatursysteme basieren daher auf den Erkenntnissen über *E. coli*.

In einer Studie von 2011 (Resende *et al.* 2011) wurden Sequenzanalysen mit *C. glutamicum* durchgeführt und die vorhandenen Reparaturgene in Corynebakterien aufgelistet. Diese Untersuchungen dienten ebenfalls als Grundlage für diese Arbeit.

Es gibt für die Zelle verschiedene Strategien, DNA-Schäden zu beheben. Je nach Art des Schadens kommen dabei unterschiedliche Reparatursysteme zum Einsatz. Bevor die einzelnen DNA-Reparaturwege in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden, hier zunächst ein grober Überblick.

Der wohl einfachste Mechanismus ist die direkte Umkehr eines Schadens ohne die DNA zu schneiden. Zu dieser Direkten Reparatur (DR) gehört ebenso die Prävention, also die Vermeidung des Einbaus falscher Basen. In Kapitel 1.3.1 wird dieser Mechanismus genauer erklärt. Die sog. Basenexzisionsreparatur (BER) kommt dann zum Einsatz, wenn eine geschädigte Base aus der DNA entfernt werden muss (siehe 1.3.2). Bei diesem Reparaturweg werden DNA-Glykosylasen eingesetzt, die die geschädigte Base erkennen und aus der DNA herausschneiden (Xu et al. 2008b). Zur Behebung von Schäden, die die Struktur der DNA-Doppelhelix verändern, müssen ganze Nukleotide entfernt werden. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) nutzt einen Proteinkomplex, der mehrere Basen gleichzeitig ausschneidet (siehe 1.3.3) und die entstandene Lücke wieder füllt. Ein weiterer Reparaturweg ist die Rekombinationsreparatur (RR). Sie wird benötigt um Doppelstrangbrüche (DSBs) zu beheben. Hierbei werden Genombereiche mit homologen Bereichen als Matrize verwendet und diese Sequenzinformationen an die Stelle kopiert wo sich der DSB befindet. Der genaue Mechanismus wird in Kapitel 1.3.4 erklärt. Die methylierungsabhängige *Mismatch* Reparatur (MMR) ist, wie der Name schon sagt, für die Reparatur von Basenfehlpaarungen verantwortlich. Hierbei wird die falschgepaarte Base im unmethylierten, also jüngeren Tochterstrang herausgeschnitten.

1.3.1 Direkte Reparatur

Die DR ist die einfachste Form eine DNA-Läsion zu reparieren. In einem Schritt wird hierbei die Basenmodifizierung behoben, ohne die Base selbst zu entfernen, wie es bei der BER der Fall ist (Nieminuszczy und Grzesiuk 2007). Einen DNA-Schaden sofort umzukehren ist sehr sinnvoll, da eine aufwendige und energieintensive Reparatur dadurch überflüssig wird. Die Zelle kann somit ihre Ressourcen für andere Prozesse nutzen. Neben der direkten Umkehr gehört auch die Prävention zur DR.

Bei der Prävention wird der Einbau defekter Basen in die DNA verhindert. Eines der wichtigsten Enzyme bei diesem Prozess ist MutT. Dieses Protein erkennt Basenanaloga und baut diese in der Zelle ab. So wird z.B. 8-Oxo-dGTP durch MutT zu 8-Oxo-dGMP hydrolysiert und wird somit nicht mehr von den DNA-Polymerasen erkannt und in die DNA eingebaut (Maki und Sekiguchi 1992). In *C. glutamicum* ist ebenfalls ein Gen für MutT vorhanden (*mutT*).

In Folge des Einbaus von Uracil kann es zur Fragmentierung der DNA kommen. Neben dem Entfernen von Uracil aus der DNA mit Hilfe der Uracil-DNA-Glykosylase (siehe BER 1.3.2) kann auch hier der Einbau der falschen Base durch die dUTPase verhindert werden. Dieses Enzym hydrolysiert dUTP zu dUMP, wodurch es auch hier nicht mehr zum Einbau der modifizierten Base kommen kann. In *C. glutamicum* wird dieses Protein von *dut* codiert.

Alkylierende Substanzen können Basen so verändern, dass es zu Transitionen kommt (siehe 1.2.2.3). Sog. Methyltransferasen können diese Alkylierung, im Wesentlichen Methylierungen, wieder rückgängig machen, indem sie die Methylgruppe aufnehmen. Die alkylierte Base (z.B. O⁶-Methylguanin oder O⁴-Methylthymin) wird bei diesem Prozess von der Alkyltransferase erkannt und der Alkylrest auf einen Cysteinrest des Proteins übertragen (Pegg 2011; Tubbs *et al.* 2007). In *E. coli* existieren zwei Alkyltransferasen. Zum einen die konstitutiv exprimierte O⁶-Alkylguanin-Transferase (Ogt) (Potter *et al.* 1987) und das Genprodukt von *ada*, einer weiteren O⁶-Alkylguanin-Transferase (Schendel und Robins 1978; McCarthy *et al.* 1984; Teo *et al.* 1984). Ogt transferiert Alkylgruppen von O⁶-Alkylguanin und O⁴-Alkylthymin auf einen eigenen Cysteinrest und inaktiviert sich damit selbst, so dass dieses Enzym immer nur einen einzigen Schaden beheben kann (Samson 1992). Die zweite O⁶-Alkylguanin-Transferase Ada hat eine ähnliche Funktion. Allerdings besitzt dieses Protein einen zusätzlichen Cysteinrest (Cys38), über den auch die Entfernung einer Alkylgruppe aus dem Zuckerphosphatrückgrat der DNA (Methylphosphotriester) ermöglicht wird. Ist dieser Cysteinrest (Cys38) methyliert, induziert Ada unter anderem die Expression seines eigenen Gens (Samson und Cairns 1977; Teo *et al.* 1984). In *C. glutamicum* sind zu *ogt* und *ada* orthologe Gene ebenfalls vorhanden (Resende *et al.* 2011).

Ein weiteres Enzym der direkten Reparatur ist die oxidative Demethylase AlkB. Sie wird von dem gleichnamigen Gen exprimiert und liegt sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* vor. Dieses Enzym erkennt die alkylierten Basen N¹-Methyladenin und N³-Methylcytosin. Unter Bildung von Formaldehyd wird die Methylgruppe entfernt (Begley und Samson 2003; Falnes *et al.* 2002).

Außerdem existiert noch ein weiterer Mechanismus der DR. Durch diesen können UV-Schäden zusätzlich durch eine direkte Photo-Reaktivierung wieder behoben werden. Bei diesem Mechanismus kommt ein einziges Protein zum Einsatz, die Photolyase (PhrB). Mit Hilfe

sichtbaren Lichtes (340 bis 400 nm) kann dieses Enzym CPDs durch Spaltung des Cyclobutan-Rings wieder beseitigen. Durch das Zusammenspiel von Lichtenergie und zweier Cofaktoren, den Chromophoren 5,10-Methylentetrahydrofolat und Flavinadenin-Dinukleotid, werden über eine Reduktion Elektronen freigesetzt, die zur Spaltung des Cyclobutan-Ringes führen (Sancar 1994).

1.3.2 Basenexzisionsreparatur

Muss eine einzelne geschädigte Base aus der DNA entfernt werden, kommt die BER zum Einsatz. Sie ist der wichtigste Reparaturmechanismus für diese Art der Schäden (Dalhus *et al.* 2009). Unter anderem ist sie für die Reparatur von oxidativ geschädigten Basen verantwortlich. Diese werden durch ROS gebildet. Außerdem werden auch alkylierte Einzelbasen durch die BER entfernt. Der Mechanismus der BER wird durch die sog. DNA-Glykosylasen initiiert (Lindahl 1976). Diese Gruppe von Enzymen erkennt geschädigte DNA-Basen und spaltet durch Hydrolyse die N-glykosidische Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat. In *E. coli* sind mehrere DNA-Glykosylasen bekannt. Sie besitzen eine hohe Substratspezifität. Auch in *C. glutamicum* wurden verschiedene DNA-Glykosylasen gefunden (Resende *et al.* 2011). Sie erkennen ebenfalls unterschiedliche Substrate.

Erkennt eine DNA-Glykosylase eine geschädigte Base, so wird diese um 180° aus der Doppelhelix herausgedreht (*base flipping*). Durch das Schneiden der N-glykosidischen Bindung hinterlassen sie eine Stelle ohne gebundene Base, eine abasische Stelle (*engl.: apurinic oder apyrimidinic site* bzw. AP-Stelle) (Fromme *et al.* 2004). Bezüglich ihres Reaktionsmechanismus können die DNA-Glykosylasen in zwei Kategorien eingeteilt werden. Es gibt mono- und bifunktionale Glykosylasen. Monofunktionale Glykosylasen nutzen ein aktiviertes Wassermolekül für einen nukleophilen Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom. Daraus resultieren folglich eine freie Base und eine AP-Stelle. Die Akkumulierung dieser AP-Stellen ist für die Zelle toxisch, weshalb diese Stellen weiter prozessiert werden müssen (Guillet und Boiteux 2002; Loeb und Preston 1986; Yu *et al.* 2003). Im Fall der monofunktionalen Glykosylasen wird deshalb für den weiteren Mechanismus eine sog. AP-Endonuklease (APE) benötigt. Dieses Enzym hydrolysiert im Anschluss die 5'-Phosphodiesterbindung im Zucker-Phosphat-Rückgrat. Hierbei wird ein Einzelstrangbruch mit einem 3'-Hydroxyl- und einem 5'-

Desoxyribose-Phosphat-Ende generiert. In *E. coli* übernehmen entweder die Exonuklease III oder die Endonuklease IV diese Aufgabe. Sie schneiden 5' der AP-Stelle. Im Anschluss daran wird eine Desoxyribosephosphodiesterase (dRPase) benötigt, um die Desoxyribose zu entfernen und ein 5'-Phosphat-Ende freizulegen. Diese Einzel-Nukleotid-Lücke wird daraufhin mithilfe der DNA-Polymerase I gefüllt und durch die DNA-Ligase verschlossen (Dianov *et al.* 1992; Dianov und Lindahl 1994). Für einen besseren Überblick ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 7) die BER schematisch dargestellt.

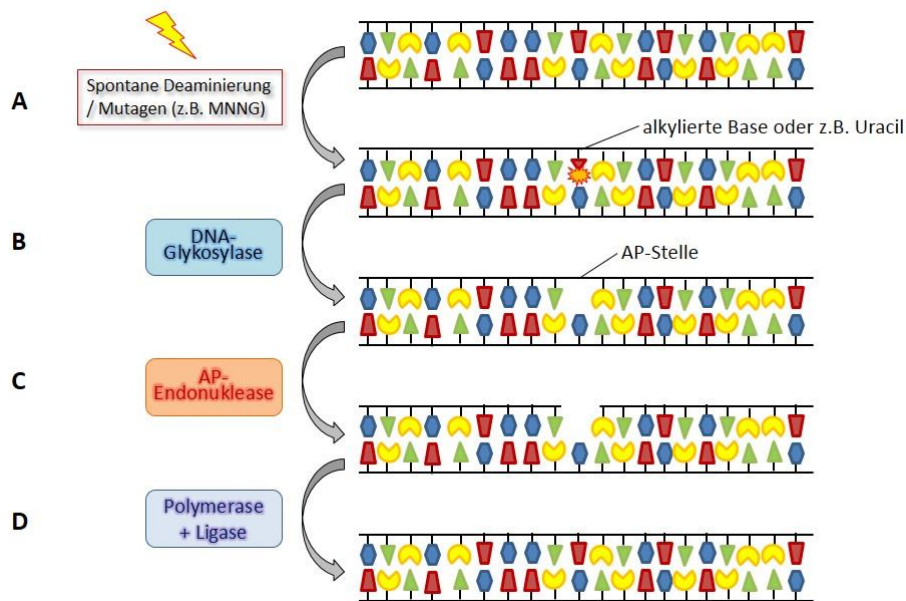


Abbildung 7: Vereinfachte schematische Darstellung der BER

Basenmodifikationen durch spontane Desaminierung oder induzierte Alkylierung (A) können zu Transitionen/Transversionen führen. DNA-Glykosylasen erkennen diese veränderten Basen und initiieren durch die Entfernung der geschädigten Base die BER (B). Hierbei entsteht eine AP-Stelle. Nucleasen entfernen den Rest des Nukleotids (C). Die entstandene Lücke wird dann mittels einer DNA-Polymerase und einer Ligase wieder aufgefüllt und verschlossen (D).

Bifunktionale Glykosylasen hingegen sind durch ihre integrierte Lyase-Aktivität in der Lage, den Schnitt des Zucker-Phosphat-Rückgrats selbst durchzuführen (Zharkov 2008) (Abbildung 8). Man kann hierbei zwischen zwei verschiedenen Folgereaktionen unterscheiden. Zum einen können bifunktionale Glykosylasen eine sog. β -Eliminierung katalysieren. In diesem Fall wird

am 3'-Ende ein ungesättigtes Hydroxyl-Aldehyd und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe zurückgelassen (Svilar et al. 2011). Um ein 3'-OH-Ende zu erhalten, das wiederum als Angriffspunkt für die DNA-Polymerase dienen kann, wird in einem nächsten Schritt die Hydroxyl-Aldehyd-Gruppe entfernt. In *E. coli* erfolgt dieser Schritt durch die Exonuklease III oder die Endonuklease IV (Warner *et al.* 1980; Demple *et al.* 1986). Alternativ dazu kann die Katalyse zum Einzelstrangbruch durch eine β,δ -Eliminierung erfolgen. Bei dieser Reaktion wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat auf beiden Seiten der AP-Läsion geschnitten, wobei ein ungesättigtes Hydroxylaldehyd frei wird und an beiden Enden eine Phosphatgruppe verbleibt (Wiederhold et al. 2004; Das et al. 2006). Zur weiteren Generierung eines Substrates für die DNA-Synthese wird anschließend durch Hydrolyse der Phosphatgruppe ein 3'-OH-Ende gebildet. Die folgende Abbildung fasst den Reaktionsmechanismus mono- und bifunktionaler Glykosylasen schematisch zusammen.

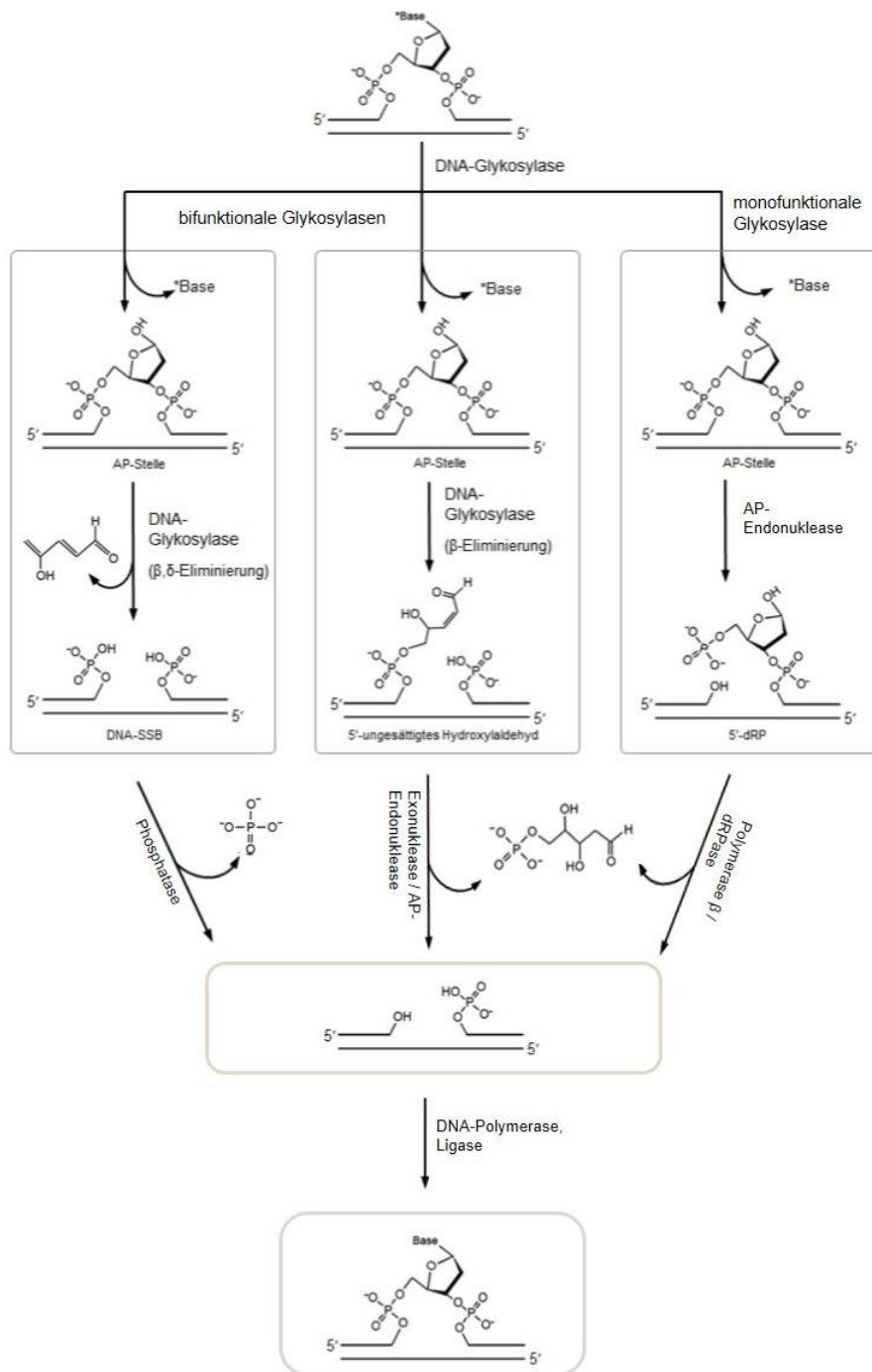


Abbildung 8: Funktionsschema mono- und bifunktionaler DNA-Glykosylasen (short patch)

Die geschädigte Base wird zunächst von einer DNA-Glykosylase erkannt und durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker entfernt, wobei eine AP-Stelle entsteht. Im Falle der monofunktionalen Glykosylasen (rechts) katalysiert eine AP-Endonuklease einen Schnitt 5' der AP-Stelle, wobei eine Deoxyribose am 5'-Ende verbleibt. Diese wird anschließend

durch eine dRPase (hier: Polymerase β) entfernt. Bifunktionale Glykosylasen nutzen Amin als Nukleophil für die Spaltung der glykosidischen Bindung, wodurch als Intermediat eine sog. Schiff'sche Base entsteht. Die integrierte Lyase-Aktivität der bifunktionalen Glykosylasen führt zum Aufbrechen der Zucker-Phosphat-Bindung in 3'-Position (β -Eliminierung) (Mitte) bzw. 3'- und 5'-Position (β,δ -Eliminierung) (links) der Läsion. Im Falle der β -Eliminierung wird in einem nächsten Schritt das ungesättigte Aldehyd durch die Phosphodiesterase-Funktion einer Exonuklease oder Endonuklease entfernt. Findet eine β,δ -Eliminierung statt, muss anschließend die Phosphatgruppe am 3'-Ende hydrolysiert werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer Polynukleotidkinase/-phosphatase. Zur vollständigen Reparatur wird dann die entstandene Lücke durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und mittels einer Ligase verschlossen.

In einem alternativen Reaktionsweg, bekannt aus Eukaryoten, können DNA-Polymerasen einen Teil des alten Stranges verdrängen. Durch eine weitere Endonuklease wird das 5'-Ende als Teil eines DNA-Oligomers abgespalten. Dieses Enzym wird als Flap-Endonuklease bezeichnet, da es für die Abspaltung des abgelösten Strangstücks (*engl.: Flap*) zuständig ist. Die entstandene Lücke wird durch die DNA-Polymerase und Ligase verschlossen (Dianov und Lindahl 1994).

1.3.2.1 DNA-Glykosylasen

Es sind 5 verschiedene Superfamilien von Glykosylasen bekannt (Fromme *et al.* 2004). Diese sind vor allem in *E. coli* gut charakterisiert. Im Folgenden werden die Enzyme genauer vorgestellt, die auch in *C. glutamicum* vorhanden sind.

Uracil-DNA-Glykosylase (UDG)

Durch den Einbau von dUTP während der Replikation oder durch Desaminierung von Cytosin tritt Uracil immer wieder in der DNA auf. UDGs gehören zu den monofunktionalen Glykosylasen. Sie erkennen und entfernen Uracil aus einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA, indem Uracil hydrolysiert wird und eine AP-Stelle entsteht (Pearl 2000). Somit wird

verhindert, dass bei der nächsten Replikation eine G:C-A:T-Transition entsteht. Gegenüber natürlichen Pyrimidinen und Uracil in RNA ist dieses Enzym inaktiv (Stivers 2008). Es wurden verschiedene UDGs in verschiedenen Organismen beschrieben. Eine davon ist Ung. Sie ist am meisten verbreitet und am besten untersucht. Auch in *C. glutamicum* liegt Ung vor und wird von dem gleichnamigen Gen *ung* codiert. Dieses Enzym gehört zur Klasse 1 der UDGs, welche 2 konservierte Aminosäure-Sequenzmotive aufweisen (Lindahl *et al.* 1977; Varshney *et al.* 1988; Slupphaug *et al.* 1996).

Formamido-Pyrimidin-DNA-Glykosylase (FaPyDG) und das GO-System

Die FaPyDG MutM (auch Fpg genannt) ist für das Entfernen oxidierter Purine zuständig und verfügt über eine eigene AP-Lyaseaktivität (David *et al.* 2007). Vor allem Guanin ist äußerst anfällig für den Angriff von ROS und wird durch die Oxidation zu 8-Oxo-dG umgewandelt. Die Reparatur von Schäden dieser Art wird durch das sog. GO-System unterstützt (Lu *et al.* 2001). Dabei handelt es sich um ein bakterielles Schutzsystem gegen genotoxische Effekte von oxidativen Guaninschäden. In *C. glutamicum* werden die Proteine des GO-Systems von *fpg/mutM*, *mutT* und *mutY* codiert. Bei MutM handelt es sich um eine Glykosylase, die Formamido-Pyrimidin-Addukte (entstanden durch die Öffnung des Imidazol-Ringes von Guanin) aus der DNA entfernt (Chetsanga und Lindahl 1979). Es wurde aber auch gezeigt, dass MutM/FPG auch andere Purine mit geöffneter Ringstruktur erkennt (Boiteux *et al.* 1992; Chetsanga und Frenette 1983; Chetsanga *et al.* 1982). Außerdem verfügt dieses Enzym über eine AP-Endonukleaseaktivität (Bailly *et al.* 1989; O'Connor und Laval 1989) und dRPase-Aktivität (Graves *et al.* 1992). MutY hingegen, ist für die Entfernung der fehlgepaarten Base Adenin zuständig (Au *et al.* 1988; Lu und Chang 1988; Su *et al.* 1988), wie sie in Folge der Bildung von 8-Oxo-dG entstehen kann. Ein N-terminaler Prolinrest im aktiven Zentrum dieses Enzyms führt dabei den nukleophilen Angriff auf das Substrat durch. MutY übernimmt in der DNA-Reparatur eine Sonderstellung, da es im Gegensatz zu den anderen Glykosylasen keine geschädigte sondern eine native Base aus der DNA entfernt (Noll *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1998). Dieses Enzym wird auch der Reparatur von Basenfehlpaarungen (*mismatch* Reparatur) zugeordnet (siehe 1.3.5). MutT hydrolysiert 8-Oxo-dGTP zu 8-Oxo-dGMP (Maki und Sekiguchi 1992). Es handelt sich also um eine Oxoguanin-Triphosphatase. Dadurch wird der Einbau der geschädigten Base und damit die Fehlpaarung mit Adenin verhindert.

3-Methyladenin-DNA-Glykosylasen (3-MeADG)

Viele Agenzien, wie auch MNNG, alkylieren DNA-Basen. Dabei entsteht unter anderem 3-Methyladenin. Es gibt mehrere DNA-Glykosylasen, die für den Abbau methylierter Basen zuständig sind. Ihre Substratspektren überschneiden sich teilweise. Bestimmte Alkylierungen, wie 7-Methylguanin, führen zur Bildung von AP-Stellen, indem sie die nicht-enzymatische Depurinierung fördern (Nilsen und Krokan 2001). In *E. coli* und auch in *C. glutamicum* liegen 2 verschiedene 3-MeDGs vor: AlkA und TagI. TagI (Gen: *tagI*) katalysiert spezifisch die Freisetzung von 3-Methyladenin (Bjelland *et al.* 1993; Bjelland und Seeberg 1987), während AlkA über ein breites Substratspektrum verfügt (Lindahl 1982). Letzteres erkennt verschiedene 3-Methylpurine und 7-Methylpurine. Bei oxidativem Stress kommt es zur vermehrten Synthese dieses Proteins (Boshoff *et al.* 2003), was darauf schließen lässt, dass AlkA zum Teil auch einzelne Oxidierungsmodifikationen erkennt und aus der DNA entfernt. Es handelt sich hierbei um monofunktionale DNA-Glykosylasen ohne eigene AP-Lyase-Aktivität.

1.3.2.2 AP-Endonukleasen

Wie bereits beschrieben, hinterlässt die Aktivität der monofunktionalen DNA-Glykosylasen abasische Stellen. Diese AP-Stellen blockieren die Replikation (Boiteux und Guillet 2004). Für die Reparatur ist es essentiell diese AP-Stellen weiter zu bearbeiten. Die AP-Endonuklease erzeugt dabei ein freies 3'-OH-Ende, welches als Startpunkt für die folgende DNA-Polymerase-katalysierte Auffüllreaktion verwendet wird. In *C. glutamicum* liegen die AP-Endonuklease III (Nth) und VIII (Nei) vor. Diese beiden Enzyme werden ebenfalls zu den bifunktionalen DNA-Glykosylasen gezählt, da sie neben ihrer AP-Lyase-Funktion auch befähigt sind, geschädigte Basen (z.B. oxidierte Pyrimidine) aus der DNA zu entfernen.

Außerdem gibt es noch eine Exonuklease III (Xth). Xth hydrolysiert die Phosphodiesterbindung 5' zur AP-Stelle, wodurch ein 3'-OH-Ende und eine 5'-Desoxyribose entstehen. Im Gegensatz dazu schneiden Nei und Nth 3' des abasischen Zuckers und generieren ein 5'-Phosphat-Ende. In *E. coli* ist die Exonuklease III für 80 % der zellulären AP-Endonuklease-Aktivität zuständig (Weiss 1981; Kow 1989).

1.3.3 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Hinsichtlich des Schadensspektrums ist die NER der wohl vielseitigste Reparaturmechanismus (Hoeijmakers 2001). Die NER ist zuständig für die Beseitigung chemischer Modifikationen der DNA, welche strukturelle Veränderungen der Doppelhelix hervorrufen. Diese Läsionen werden als „*bulky adducts*“ bezeichnet und können zum Anhalten des Replikationsapparates führen. Zu diesen Schäden zählen vor allem die Quervernetzungen, die durch UV-Strahlung entstehen. Die NER nutzt diese strukturelle und chemische Veränderung zur Erkennung (Hess *et al.* 1997; Wood 1999). Die Zelle ist in der Lage diese „*bulky adducts*“ von anderen Strukturveränderungen, wie Einzelstrangschlaufen, zu unterscheiden. Jedoch ist die NER durchaus in der Lage auch andere Läsionen zu erkennen und zu reparieren. Dazu gehören auch Basenmodifikationen die durch Alkylierungen oder Oxidationen verursacht werden. Diese werden zwar in erster Line durch die BER behoben, die NER dient hier aber als eine Art Sicherheitssystem und kann die Aufgabe der BER übernehmen (Satoh *et al.* 1993).

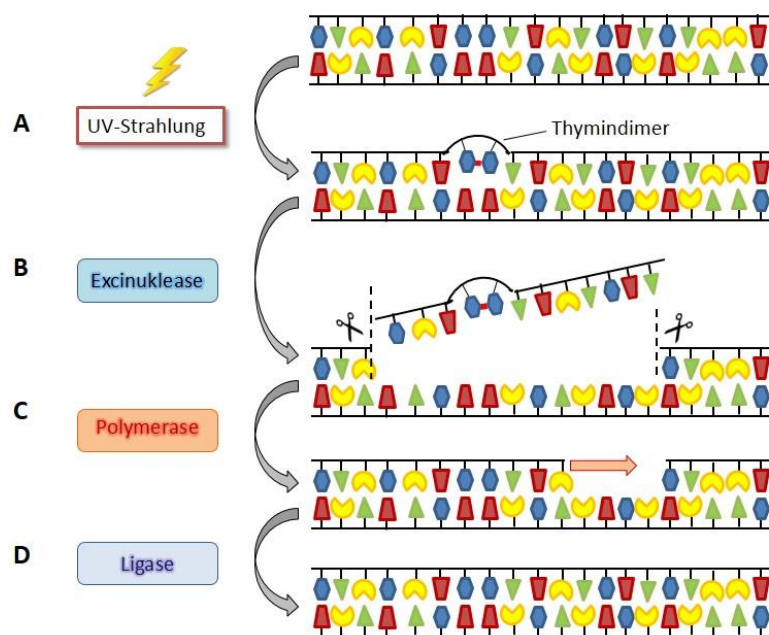


Abbildung 9: Mechanismus der NER

Unter Wirkung von UV-Strahlung können sich zwei benachbarte Thymine miteinander verbinden (A). Die Excinuklease erkennt den Schaden und schneidet ein Fragment von 12 bis 30 Nukleotiden aus (B). Die DNA-Polymerase füllt die entstandene Lücke auf (C), welche durch die Ligase vollständig verschlossen wird (D).

Abbildung 9 stellt die Reparatur von Thymindimeren durch die NER dar. Nachdem ein Schaden durch die NER erkannt wurde, kommt es zu einer doppelten Inzision auf der 5'- und der 3'-Seite der Läsion. Dabei wird ein kurzes DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 30 Nukleotiden entfernt. Anschließend wird diese Einzelstranglücke durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und durch eine Ligase geschlossen.

1.3.3.1 Enzyme der NER

In *E. coli* und auch in *C. glutamicum* wird die NER durch 3 Enzyme vermittelt: UvrA, UvrB und UvrC. Die Deletion der entsprechenden Gene führte zu einem UV-sensitiven Genotyp, so dass die Funktion von *uvrA*, *uvrB* und *uvrC* der Reparatur UV-induzierter Schäden zugeordnet werden konnte (van de Putte *et al.* 1965; Howard-Flanders und Theriot 1966). Die Vermittlung der UV-Resistenz war namensgebend für die an der NER beteiligten Enzyme. UvrA liegt unter normalen Wachstums-Bedingungen nur in geringen Mengen (20 bis 25 Moleküle) in der Zelle vor. Auch UvrB ist nur begrenzt vorhanden (ca. 250 Moleküle). Die Expressionsrate dieser Proteine ist unmittelbar an die SOS-Antwort der Zellen gekoppelt (Howard-Flanders *et al.* 1966; Kenyon und Walker 1981). Nach der SOS-Induktion steigt die Zahl dieser Proteine um den Faktor 10 (UvrA) bzw. 4 (UvrB). Auch von UvrC sind nur etwa 10 Moleküle pro Zelle vorhanden. Seine Expression kann jedoch nicht durch die SOS-Antwort induziert werden (van Houten 1990).

UvrA ist eine DNA-unabhängige ATPase und ein DNA-Bindeprotein. Aufgrund der hochkonservierten Walker TypA und TypB Nukleotid-Erkennungsmotive wird UvrA auch zu der Superfamilie der ABC-Transporter gerechnet. In Abhängigkeit von ATP kommt es zunächst zu einer Dimerisierung (Mazur und Grossman 1991). Das dimerisierte Protein UvrA₂ ist nun in der Lage zusammen mit ein oder zwei UvrB-Molekülen einen Komplex zu bilden (Orren und Sancar 1989; Malta *et al.* 2007). UvrA₂B bzw. UvrA₂B₂ besitzt eine limitierte Helikaseaktivität in Anwesenheit von ATP, durch die doppelsträngige DNA unidirektional in kurzen Bereichen aufgeschmolzen wird. Man nimmt an, dass dies zur Translokation des Komplexes dient. Während der Translokation ist UvrA für die Bindung an die DNA zuständig. Der Komplex stoppt schließlich an bestimmten Verformungen der DNA. Im Anschluss daran wird UvrA abgespalten und UvrB bildet mit dem geschädigten DNA-Strang einen Komplex (Truglio *et al.* 2004). Es

kommt zur Aktivierung der UvrB Helikaseaktivität, die die beiden DNA-Stränge im Bereich des DNA-Schadens auftrennt. Es kommt zu einem systematischen Herausklappen der Basen in diesem Bereich, die zu Tyrosinresten von UvrB in Wechselwirkung treten. Diese Wechselwirkung ist schwach und instabil, wenn die Basen keine Schädigung tragen und schließlich dissoziiert UvrB und DNA. Handelt es sich dagegen um eine modifizierte Base, bleibt der Komplex stabil (Truglio *et al.* 2006). In diesem Zustand kann UvrC an den Komplex binden und katalysiert, nach einer weiteren ATP-Bindung von UvrB, die Phosphodiester-Spaltung im Bereich des Schadens. Die Schnitte erfolgen zwischen dem vierten oder fünften Nukleotid in 3'-Richtung und im Abstand von etwa 8 Nukleotiden in 5'-Richtung (Lin und Sancar 1992). Die genaue Position ist jedoch abhängig von der Art des Schadens und der Sequenz. Nach dem Schneiden dissoziiert UvrC von der DNA und ein weiteres Enzym, die Helikase UvrD, entfernt den ausgeschnittenen Einzelstrang (Orren *et al.* 1992). Die entstandene Lücke wird von der Polymerase I aufgefüllt und UvrB löst sich von dem neusynthetisierten Strang ab (Husain *et al.* 1985).

1.3.4 Homologe Rekombination (HR)

Die homologe Rekombination wurde schon früh als treibender Faktor der bakteriellen Evolution durch Genaustausch beschrieben. Man hielt diese Funktion lange für die Hauptaufgabe der homologen Rekombination. Erst nachdem bekannt wurde, dass Mutanten der HR deutlich sensitiver gegen einige DNA-Schäden sind, wurde die primäre Rolle der homologen Reparatur erkannt (Courcelle *et al.* 2001). Doppelstrangbrüche (DSBs) sind besonders gefährliche Läsionen. Schon ein einziger nicht reparierter DSB kann zum Zelltod führen (Khanna und Jackson 2001). Im Unterschied zur beschriebenen Reparatur von Basenschäden (siehe 1.3.2 und 1.3.3) sind bei der Reparatur von DSBs beide Stränge von dem Schaden betroffen. Hier fehlt also die Matrize für die Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenzinformation. Die Reparatur solcher Schäden wird durch zwei verschiedene Mechanismen verfolgt. In einem der beiden Mechanismen werden beliebige durch DSBs verursachte DNA-Enden miteinander verknüpft. Dies erfolgt unabhängig von der Struktur und Sequenz dieser Enden. Dieser Mechanismus wird als nichthomologes Verknüpfen von Enden (*engl.: nonhomologous endjoining* (NHEJ)) bezeichnet. Dabei können einzelne Nukleotide

deletiert oder inseriert werden, was diesen Mechanismus potenziell mutagen macht (Pfeiffer *et al.* 2000). Über diesen Mechanismus ist in *C. glutamicum* nichts bekannt.

Die zweite, erheblich genauere Strategie, wird durch die homologe Rekombinationsreparatur (RR) beschrieben. Durch diesen Reparaturweg werden nicht nur DSBs sondern auch einzelsträngige Bereiche (auch Tochterstranglücken (TSLs) genannt) behoben. Sie können die Replikationsgabel stoppen und somit den Zelltod hervorrufen, wenn sie nicht repariert werden. Es sind 40 Enzyme bekannt, die an der RR beteiligt sind (Eisen und Hanawalt 1999; Fernandez *et al.* 2000; Amundsen und Smith 2003). Dieser Sachverhalt macht die RR zu einem der komplexesten Mechanismen der Reparatur. Die Reparatur erfolgt in 4 Schritten. Zunächst wird der Schaden erkannt und die Reparatur initiiert. Im nächsten Schritt erfolgt der Strang-Austausch, bevor die Migration der Holliday-Strukturen erfolgt. In einem letzten Schritt wird die Holliday-Struktur aufgelöst (Connolly *et al.* 1991).

1.3.4.1 Die präsynaptische Phase:

Reparatur von DSBs – Der RecBCD-Weg

Bei der RR werden Sequenzinformationen aus Genombereichen mit homologen Sequenzen als Matrize genutzt. Somit wird die benötigte Information an die Stelle kopiert, an der sich der DSB befindet. Zu Beginn dieses Reparaturweges werden an dem DSB lange Einzelstrangenden generiert. Dies erfolgt durch Degradation des DSB-Endes mit Hilfe einer 5'-3'- bzw. 3'-5'-Exonuklease. In *E. coli* übernimmt diese Aufgabe RecBCD (Kowalczykowski *et al.* 1994; Smith *et al.* 1995; Myers und Stahl 1994). Dieser Enzymkomplex, bestehend aus RecB, RecC und RecD, agiert als bipolare Exonuklease und Helikase und trennt die Doppelhelix in ihre Einzelstränge auf. Gleichzeitig baut sie diese ab. Dies geschieht solange, bis der Komplex auf eine sog. *Chi*-Stelle (χ -Stelle) trifft. Es handelt sich hierbei um eine 8 Nukleotide umfassende Sequenz (5'-GCTGGTGG-3'), die im Schnitt alle 4000 Bp im *E. coli*-Genom vorliegt (Smith *et al.* 1981). Ist keine χ -Stelle vorhanden, wird der Doppelstrang vollständig abgebaut. Trifft RecBCD jedoch auf eine solche Stelle, wird der Abbau beider Stränge abgebrochen (Dixon und Kowalczykowski 1993). Die χ -Stelle, ursprünglich als Rekombinations-*hot spot* entdeckt (Lam *et al.* 1974; Stahl und Stahl 1974), regt die Rekombination in ihrer Umgebung um das 5- bis 10-fache an (Myers und Stahl 1994; Smith *et al.* 1995); Dixon und Kowalczykowski 1991). Diese

Stimulation ist abhängig von RecBCD. χ beeinflusst direkt die dsDNA-Endonukleaseaktivität von RecBCD (Dixon und Kowalczykowski 1993). Diese Funktion resultiert aus der Kombination einer Helikase mit anschließender endonukleolytischer Spaltung der entwundenen einzelsträngigen DNA (Muskavitch und Linn 1982). Während dabei bevorzugt das 3'-Ende abgebaut wird, kommt es nur gelegentlich auch zum Schneiden des 5'-Endes (Dixon 1993). Der 3'-Abbau wird durch die Interaktion mit einer χ -Stelle abgeschwächt, während die Helikaseaktivität weiter bestehen bleibt (Taylor *et al.* 1985). Das generierte 5'-Einzelstrangende wird auch weiter abgebaut. Der so entstehende 3'-Überhang dient nun als Substrat für den RecA-vermittelten Strang-Austausch (Anderson und Kowalczykowski 1997; Dixon und Kowalczykowski 1993). Das Beladen des 3'-überstehenden Einzelstrangs mit RecA wird dabei ebenfalls von RecBCD vermittelt.

Abbildung 10 liefert einen schematischen Überblick über diesen Mechanismus.

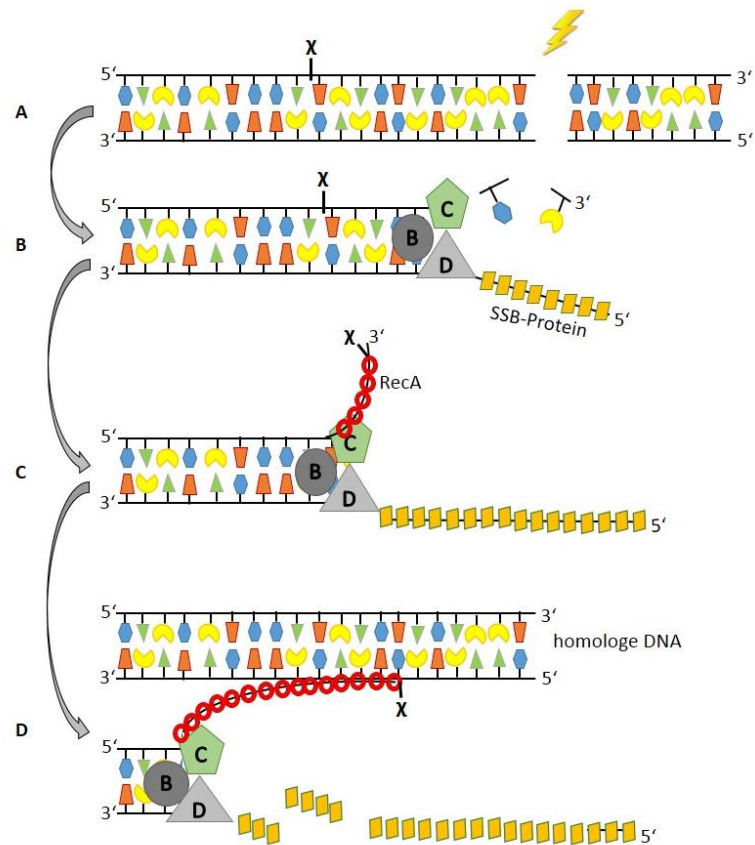


Abbildung 10: Mechanismus des RecBCD-Weges der RR

Durch Mutagene wie Zeocin können DSBs entstehen (A). Diese werden durch RecBCD erkannt und gebunden (B). Die dsDNA wird entwunden und das 3'-Ende bevorzugt abgebaut. Das 5'-Ende wird durch SSBs geschützt. Wird eine *Chi*-Stelle (χ) erreicht, wird die 3'-5'-Nukleaseaktivität reduziert und vermehrt das 5'-Ende abgebaut. Das entstehende 3'-Ende wird mit RecA beladen (C). RecA sucht im homologen Chromosom nach dem passenden Sequenzabschnitt und initiiert den Strang austausch (D).

In *C. glutamicum* liegen RecC und RecD nicht vor. Das *recB*-Gen wurde allerdings bei Sequenzanalysen gefunden (Resende *et al.* 2011). Es liegt nahe, dass in diesem Organismus die Reparatur von DSBs von einem alternativen Enzymkomplex übernommen wird (siehe AdnAB, S. 43).

Reparatur von TSLs – der RecFOR-Weg

Für die Reparatur von TSLs wird ein anderer Mechanismus benötigt. Hierbei kommen RecF, RecO und RecR zum Einsatz (Horii und Clark 1973; Wang und Smith 1984; Morimatsu und Kowalczykowski 2003, 2003). RecFOR ist für das Beladen der einzelsträngigen DNA mit RecA zuständig. Die biochemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten dieses Enzymkomplexes sind nur teilweise verstanden. Bei RecF handelt es sich um eine ATPase der ABC-Familie. Nach der Bindung von ATP dimerisiert dieses Enzym (Koroleva *et al.* 2007). In dieser Form scheint es bevorzugt an den Übergang von DNA-Einzel- zu DNA-Doppelstrang zu binden. Nach erfolgter Hydrolyse von ATP löst sich RecF wieder von der DNA (Webb *et al.* 1999; Madiraju und Clark 1992). Auch RecO kann ssDNA und dsDNA binden (Luisi-DeLuca und Kolodner 1994). RecO vermittelt die Bindung von RecA an die SSB-besetzte ssDNA und induziert die Filament-Bildung. Allerdings wird bei dieser Aktivität zusätzlich RecR benötigt (Umezu und Kolodner 1994; Ryzhikov *et al.* 2014; Alonso *et al.* 1993). Das Protein RecR besitzt keine eigene enzymatische Aktivität. Das Enzym von *E. coli* besitzt auch keine DNA-Bindestelle. Bei den Proteinen aus anderen Organismen, wie z.B. *Bacillus subtilis* oder *Deinococcus radiodurans* konnte allerdings eine Bindung an die DNA nachgewiesen werden (Alonso *et al.* 1993; Lee *et al.* 2004). In *E. coli* stimuliert RecR die DNA-Bindung von RecF oder RecO durch eine physikalische Interaktion mit diesen beiden Enzymen. RecR kann somit als zentrales Protein des RecFOR-Komplexes betrachtet werden, das die Assemblierung von RecFOR an die Substrate für die Rekombination stabilisiert (Honda *et al.* 2006; Webb *et al.* 1995).

RecFR begrenzt die Ausbildung des RecA-Filaments vom Bereich der Einzelstranglücke in die angrenzenden Doppelstrangbereiche (Webb *et al.* 1997).

Zusätzlich zu RecFOR werden bei diesem Reparaturmechanismus noch zwei weitere Enzyme benötigt, RecJ und RecQ. Bei RecJ handelt es sich um eine 5'-3'-Exonuklease, die für die Produktion eines 3'-Überhangs zuständig ist. RecQ ist eine Helikase.

Zunächst wird also durch die Helikase RecQ die DNA im Bereich der Einzelstranglücke entwunden (Harmon und Kowalczykowski 1998). RecJ baut nun das 5'- Ende ab (Lovett und Kolodner 1989).

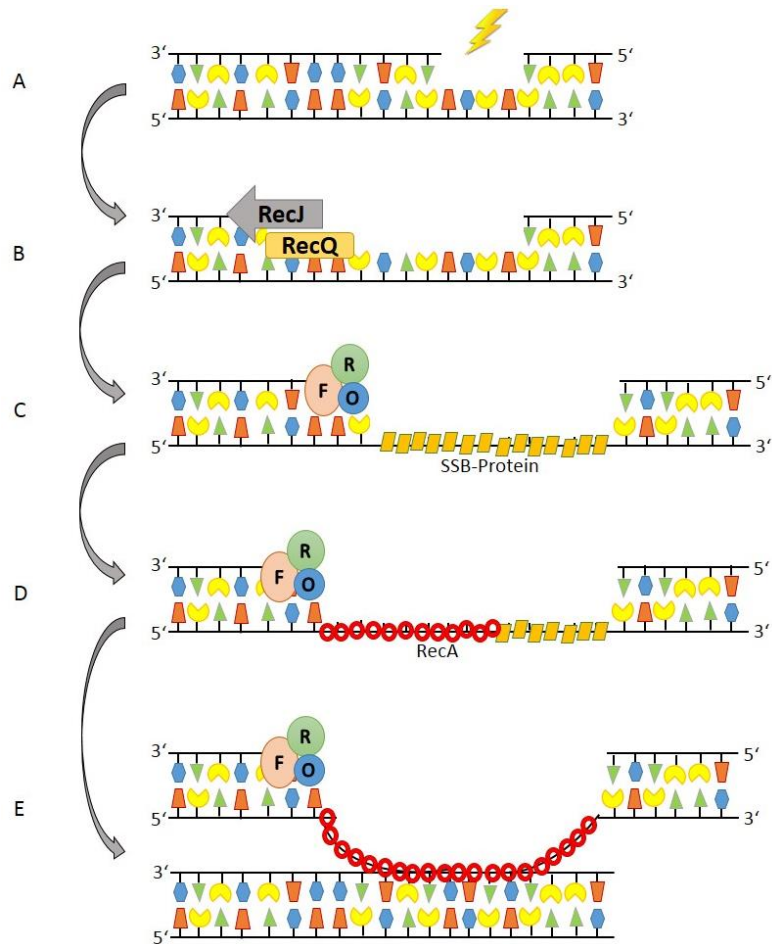


Abbildung 11: Darstellung des RecFOR-Weges der RR

(A) Trifft das Replisom auf Läsionen, die es nicht übergehen kann, können TSLs entstehen. (B) Diese werden durch die 5'-3'-Exonuklease RecJ und die Helikase RecQ erweitert. (C) Diese einzelsträngigen Bereiche werden umgehend von SSBs besetzt. RecFOR markiert diesen Bereich und lädt RecA auf die ssDNA (D). Mittels RecA wird dann der Strangtausch mit dem homologen Sequenzabschnitt auf dem Schwesterchromosom vermittelt (E).

AdnAB – Die Alternative zu RecBCD?

AdnAB wurde erstmals in Mycobakterien beschrieben (Wigley 2013; Unciuleac und Shuman 2010a, 2010b; Sinha *et al.* 2009). Dieses Protein ist an dem Abbau der Doppelsträngenden zu Einzelsträngenden bei der HR beteiligt (Gupta *et al.* 2011).

In Mycobakterien führte die Deletion von *recO* zu einer ähnlich hohen Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung wie die Deletion von *recA*. Interessanterweise waren die *recO*-

Mutanten gleichzeitig auch empfindlicher als die *adnAB*-Mutanten. Dies deutet auf die Hauptrolle des RecFOR-Systems bei der Reparatur hin (Gupta *et al.* 2013). Die gleichzeitige Deletion von *recO* und *adnAB* führte in *Mycobacterium smegmatis* zu einem völligen Ausfall der HR. Es kann also davon ausgegangen werden, dass RecO und AdnAB zwei parallele Wege der RecA-abhängigen Recombination in Mycobakterien darstellen (Gupta *et al.* 2013). Jedoch war lange nicht genau bekannt, ob AdnAB, wie RecBCD in *E. coli*, in der Lage ist RecA auf die ssDNA zu laden, oder ob ein weiterer Mediator zum Einsatz kommt, der RecA an die ssDNA führt, nachdem AdnAB die DNA entwunden und zu 3'-überstehende Einzelsträngen abgebaut hat. Diese Funktion könnte hier von RecF und RecR übernommen werden.

Aktuelle Studien in Mycobakterien haben nun gezeigt, dass AdnAB nicht in der Lage ist ssDNA mit RecA zu beladen. Hierfür wird RecR benötigt (Gupta *et al.* 2015). Dies wird auch durch weitere Untersuchungen in anderen Organismen bestätigt. Z.B. in *Bacillus subtilis* sind RecO oder auch RecR für die Bindung von RecA an die einzelsträngige DNA zuständig, obwohl auch hier ein Äquivalent zu AdnAB (AddAB) vorliegt (Carrasco *et al.* 2015).

Somit kann AdnAB den RecBCD-Weg nicht vollständig ersetzen. RecFOR wird ebenso benötigt.

1.3.4.2 Die synaptische Phase

RecA-Das Schlüsselenzym der RR und HR

Die zentrale Rolle der homologen Rekombination (HR) in *E. coli* übernimmt RecA. Dieses System hat sich vermutlich über Milliarden von Jahren entwickelt und ist in Bakterien hoch konserviert (Roca und Cox 1990). In *E. coli* ist dieses Enzym nicht nur an der HR beteiligt. Es übernimmt auch wichtige Aufgaben bei der RR und der SOS-Antwort (Rupp und Howard-Flanders 1968; Radding 1982; Dutreix *et al.* 1989; West *et al.* 1981; Smith und Wang 1989; Roberts *et al.* 1978; Radding 1988). Während viele DNA-Schäden in einem der beiden Stränge herausgeschnitten und durch die Information des intakten Stranges wieder repariert werden können, bedarf es einer aufwendigeren Reparatur-Methode wenn beide Stränge beschädigt sind und daher der zweite Strang nicht als Matrize dienen kann. Ist dies der Fall, muss die für die akkurate Reparatur benötigte Information von einem separaten homologen DNA-Molekül geliefert werden. RecA katalysiert hier den Austausch einzelner DNA-Partner-Stränge, so dass die benötigte Sequenzinformation für die Reparatur vorliegt. Der RecA-vermittelte

Strang austausch ist Bedingung für den Mechanismus der post-replikativen Reparatur von DSBs, TSLs und auch DNA-Crosslinks (Sinden und Cole 1978; Cheng *et al.* 1988; Smith und Wang 1989). Während der Wildtyp von *E. coli* eine große Menge (65 Crosslinks pro Zelle) dieser interstrangulären Verknüpfungen überleben kann, führt eine Mutation in *recA* dazu, dass schon eine einzige Läsion dieser Art für die Zelle tödlich ist (Cole 1971). Obwohl die NER den Hauptmechanismus für die Reparatur von Thymin-Dimeren darstellt, wie sie durch UV-Licht ausgelöst werden, sind RecA-Mutanten empfindlicher gegenüber diesem Mutagen als UvrA-Mutanten (Capaldo *et al.* 1974).

Die genaue Funktion von RecA wurde in vielen Studien untersucht (unter anderem Radding 1982; Smith und Wang 1989; Roca und Cox 1990). Dabei wurde immer wieder bestätigt, dass die primäre Funktion von RecA in der DNA-Reparatur liegt und die homologe Rekombination eher eine Nebenfunktion ist. (Campbell 1984; Nickoloff *et al.* 1989; Bernstein *et al.* 1985). Die homologe Rekombination und RR sind eng verwandte Mechanismen. In beiden Fällen ist der RecA-vermittelte Strangaustausch der zentrale Prozess. Hierbei bildet RecA ein Helix-förmiges Filament das aus tausenden von RecA-Monomeren bestehen kann. Obwohl schon eine große Zahl an RecA in der Zelle vorliegt, kann durch UV-Licht eine 20-fache Erhöhung induziert werden (Weinstock 1987). RecA bindet nur an einzelsträngige DNA und umwindet diese. Um den Austausch homologer Sequenzabschnitte einzuleiten, interagiert dieser Komplex mittels DNA-Bindestellen an seiner Außenseite mit einem zweiten doppelsträngigen DNA-Molekül (Howard-Flanders *et al.* 1984; Cox und Lehman 1987; Luseti und Cox 2002). Der zweite DNA-Doppelstrang wird dann nach einem Sequenzabschnitt abgetastet, der einen komplementären Bereich zur einzelsträngigen DNA trägt. Im Zuge dieses Vorgangs wird die Doppelhelix teilweise entwunden. Erreicht RecA einen komplementären Sequenzabschnitt, paart sich dieser mit der RecA-besetzten Einzelstrang-DNA. Es kommt also zum Strangaustausch und der Entstehung sog. *Holliday*-Strukturen. Der genaue Mechanismus dieser Erkennung ist allerdings noch weitgehend ungeklärt.

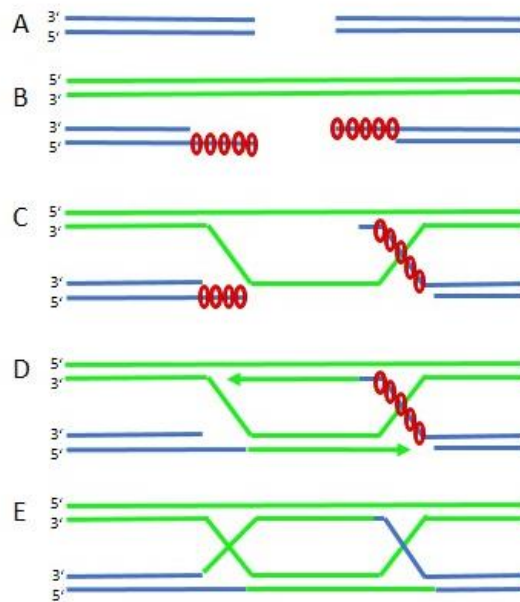


Abbildung 12: Überblick und genaue molekulare Funktion von RecA

(A) Durch Mutagene wie z.B. Zeocin entstehen DSBs. (B) RecBCD bzw. RecQJ gefolgt von RecFOR (hier nicht dargestellt) bereiten die Enden auf die HR vor und beladen die ssDNA mit RecA (rote Ellipse). Das Filament aus RecA und dem ssDNA-Abschnitt nimmt zunächst Kontakt zu einem weiteren doppelsträngigen DNA-Molekül (grün) auf und sucht nach einem homologen Sequenzabschnitt. (C) Die doppelsträngige DNA bildet vorübergehend an der Stelle der Bindung eine Blase (*D-loop*), indem einer der beiden Stränge verdrängt wird. (D) Der komplementäre Strang dient nun als Template für die DNA-Strang-Synthese. (E) Die Elongation und Ligation der Enden führt zur Ausbildung von Überkreuzungsstrukturen, die im weiteren Verlauf der HR aufgelöst werden.

1.3.4.3 Die postsynaptische Phase

Durch den Austausch homologer Einzelstränge zwischen zwei Genomen wird eine *Holliday*-Struktur bzw. eine kreuzförmige DNA mit vier doppelsträngigen Armen gebildet. Um diese Überkreuzungsstrukturen (*engl.: Holliday Junctions*) zunächst zu festigen und später aufzulösen, sind zwei redundante Systeme bekannt. Zum einen gibt es die RuvABC-Resolvase und zum anderen die RecG-Helikase (West 1996; Sharples *et al.* 1999).

RuvA bindet mit hoher Affinität als Tetramer an die Überkreuzungsstruktur (Tsaneva *et al.* 1992) und hält die vier Arme in äquidistanten Abständen symmetrisch zueinander. Durch diese Bindung wird RuvB rekrutiert (Parsons *et al.* 1992; Parsons und West 1993; Iwasaki *et al.* 1992) und bildet einen hexameren Ring um zwei sich gegenüberliegenden Arme. Die Bindung dieser Komplexe an die *Holliday junction*, hält diese in einer ausgebreiteten Konformation (Rafferty *et al.* 1996; Hargreaves *et al.* 1998). Über die Hydrolyse von ATP wird dabei Energie gewonnen, die für die Migration (*engl.: branch migration*) der Überkreuzung benötigt wird. RuvA und RuvB katalysieren nun gemeinsam eine Bewegung der Holliday-Struktur in die gleiche Richtung, in der auch RecA gearbeitet hat (Roe *et al.* 1998). Im weiteren Verlauf dissoziiert RuvA aus dem RuvAB-Komplex ab. Die Holliday-Struktur kann nun von RuvC übernommen werden. Bei RuvC handelt es sich um eine dimere Endonuklease, die spezifisch an diese Struktur bindet (Gorecka *et al.* 2013). Durch zwei Schnitte in den sich nicht überkreuzenden Strängen derselben Polarität wird die Überkreuzung aufgelöst (Dunderdale *et al.* 1991; Bennett *et al.* 1993; Shah 1994).

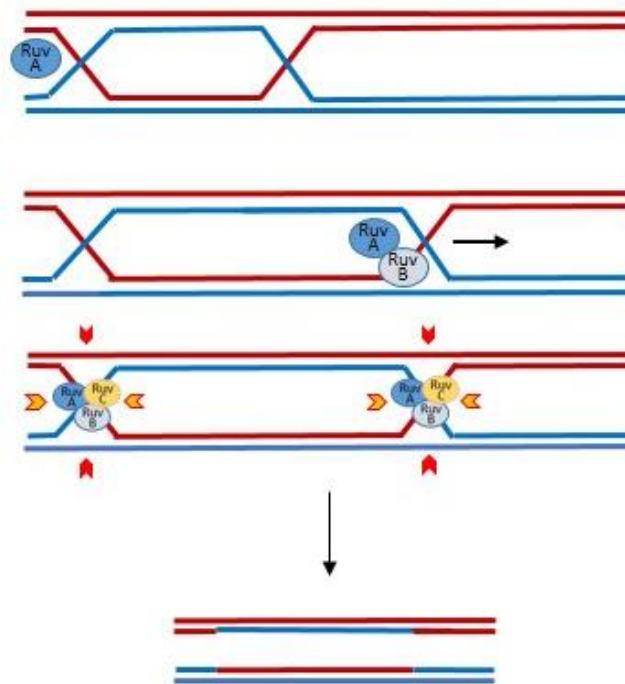


Abbildung 13: Funktionsweise von RuvABC, Auflösung der Holliday Strukturen

Die Überkreuzungsstrukturen werden von RuvA erkannt. Gemeinsam mit RuvB katalysiert RuvA eine Bewegung der *Holliday*-Strukturen (*Branch migration*). Die Endonuklease RuvC schneidet nun die beiden Stränge im Bereich der Kreuzung, so dass diese aufgelöst wird.

Sind RuvA und RuvB defekt, kann RecG aktiv werden. Bei RecG handelt es sich um eine monomere dsDNA-Translokase. Dieses Enzym ist in der Lage, verschiedene verzweigte DNA-Moleküle, wie Holliday Strukturen, D-Schleifen oder auch Replikationsgabeln zu entwinden (Lloyd und Sharples 1993; Whitby *et al.* 1993; Vincent *et al.* 1996; Fukuoh *et al.* 1997; McGlynn *et al.* 1997; Whitby und Lloyd 1998; McGlynn 2000; Briggs *et al.* 2004; Rudolph *et al.* 2010; Manosas *et al.* 2013; Gupta *et al.* 2014; Bianco 2015). Das entsprechende Gen *recG* ist in fast allen sequenzierten Bakterien gefunden worden (Sharples *et al.* 1999; Rocha *et al.* 2005). Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass RecG und RuvABC sich in ihrer Wirkung überlappen (Lloyd 1991). RecG bindet, wie RuvAB an Überkreuzungsstrukturen und stimuliert eine Migration in 3'-5'-Richtung (Whitby *et al.* 1993; Whitby und Lloyd 1995). Zur Auflösung der *Holliday Junction* wird jedoch noch eine weitere Nuklease benötigt. Allerdings wurde auch deutlich, dass die Deletion von *recG* nicht nur Auswirkungen auf die HR hat sondern auch

andere Schlüsse zulässt (Rudolph *et al.* 2010; Bianco 2015). Es konnte gezeigt werden, dass RecG ebenfalls eine Rolle bei anderen wichtigen zellulären Prozessen wie der Replikation spielt. Hier kann das Enzym zusammen mit anderen Enzymen den Neustart der Replikation bewirken, nachdem z.B. die Replikationsgabel blockiert wurde (Lloyd und Rudolph 2016).

1.3.5 Reparatur von Basenfehlpaarungen (*Mismatch*-Reparatur, MMR)

Die MMR ist, wie der Name schon sagt, für die Reparatur von Basenfehlpaarungen zuständig (Kolodner und Marsischky 1999; Kunkel und Erie 2005; Modrich und Lahue 1996). Diese können während der Replikation oder auch während der Rekombination entstehen. In *E. coli* sind mehrere Enzyme an diesem Reparaturweg beteiligt (Lahue *et al.* 1989; Burdett *et al.* 2001). MutS erkennt eine Basenfehlpaarung in der DNA und bindet als Homodimer an diese (Modrich und Lahue 1996). MutL interagiert mit MutS und führt MutH, unter Aktivierung dieses Enzyms, an den Schaden heran. MutH erkennt hemimethylierte dGATC-Sequenzen und schneidet die DNA in diesem Bereich im nicht-methylierten Strang (Ban und Yang 1998; Lee *et al.* 2005). So wird gewährleistet, dass die Reparatur im neusynthetisierten Tochterstrang und nicht im korrekten Ausgangsstrang stattfindet (Junop *et al.* 2001). MutL rekrutiert weiterhin eine DNA-Helikase (UvrD) (Dao und Modrich 1998; Guarne *et al.* 2004). Während MutH einen Bruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat verursacht, entwindet UvrD die DNA in diesem Bereich (Dao und Modrich 1998). Im Anschluss kommt eine Exonuklease (z.B. RecJ) zum Einsatz. Die dabei entstandene Lücke wird mithilfe einer DNA-Polymerase und einer Ligase wieder geschlossen (Modrich und Lahue 1996). MutS und MutH wurden in *C. glutamicum* nicht gefunden. Enzyme wie UvrD und RecJ können auch anderen Reparaturwegen zugeordnet werden (UvrD → NER, RecJ → HR). Ebenso ist auch die Adenin-Glykosylase MutY für die Reparatur von Basenfehlpaarungen von Bedeutung. Die MMR wird in dieser Arbeit nicht gesondert untersucht.

1.4 Übersicht der vorgestellten Gene der DNA-Reparatur

In Tabelle 1 sind zusammenfassend die Gene der DNA-Reparatur nochmal aufgelistet. Sie dient zur Übersicht, welche Gene in *E. coli* und welche in *C. glutamicum* vorliegen.

Tabelle 1: Übersicht der vorgestellten Gene der DNA-Reparatur in *E. coli* bzw. *C. glutamicum* und der Gene, die in *C. glutamicum* deletiert werden

Gen	Protein/Funktion	Reparaturweg	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>	deletiert
<i>ogt</i>	Alkyltransferase	DR	x	x	x
<i>alkB</i>	Oxidative Demethylase	DR	x	x	x
<i>ada</i>	Alkyltransferase	DR	x	x	
<i>mutT</i>	Deoxyguanosin-Triphosphatase	DR	x	x	
<i>dut</i>	dUTP-Hydrolase	DR		x	
<i>phrB</i>	Photolyase	DR	x		
<i>uvrA</i>	ABC-Excinuklease Untereinheit A	NER	x	x	x
<i>uvrB</i>	ABC-Excinuklease Untereinheit B	NER	x	x	
<i>uvrC</i>	ABC-Excinuklease Untereinheit C, Nuklease	NER	x	x	
<i>uvrD</i>	Helikase II	NER/MMR	x	x	x
<i>ung</i>	Uracil-DNA-Glykosylase	BER	x	x	x
<i>alkA</i>	3-Methyladenin-Glykosylase	BER	x	x	x
<i>tagI</i>	3-Methyladenin-Glykosylase	BER	x	x	x
<i>mutY</i>	Adenin-Glykosylase	BER/MMR	x	x	x
<i>mutM</i>	Fapy-DNA-Glykosylase	BER	x	x	x
<i>nei</i>	Glykosylase/Endonuklease	BER	x	x	x
<i>nth</i>	Glykosylase/Endonuklease	BER	x	x	x
<i>xth</i>	Exonuklease	BER	x	x	x
<i>recA</i>	Rekombinase	RR	x	x	x
<i>recB</i>	Exonuklease V/Helikase-UE B	RR	x	x	x
<i>recC</i>	Exonuklease V/Helikase-UE C	RR		x	
<i>recD</i>	Exonuklease V/Helikase-UE D	RR		x	
<i>recQ</i>	Helikase	RR	x	x	
<i>recJ</i>	5'-3'-Exonuklease	RR/MMR	x	x	x
<i>adnAB</i>	Helikase/Nuklease	RR	x		x
<i>recF</i>	ssDNA und dsDNA-Bindung	RR	x	x	
<i>recO</i>	ssDNA-Bindung/ Laden von RecA	RR	x	x	x
<i>recR</i>	ssDNA/RecA-Stabilisierung	RR	x	x	
<i>ssb</i>	Einzelstrang-Bindeprotein	RR	x	x	
<i>ruvA</i>	DNA-Bindeprotein	RR	x	x	
<i>ruvB</i>	<i>holiday junction</i> Helikase	RR	x	x	x
<i>ruvC</i>	Resolvase	RR	x	x	

Gen	Protein/Funktion	Reparaturweg	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>	deletiert
<i>recG</i>	3'-5'-Helikase	RR	x	x	x
<i>mutS</i>	Erkennung der Fehlpaarung	MMR		x	
<i>mutL</i>	T:G- <i>mismatch</i> -Endonuklease	MMR	x	x	
<i>mutH</i>	Endonuklease	MMR		x	

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war in erster Linie, ein größeres Verständnis für die DNA-Reparatur in *C. glutamicum* zu erlangen. Die DNA-Reparatur ist ein essenzieller Mechanismus in jedem Lebewesen und wurde in verschiedenen Modellorganismen bereits intensiv untersucht. Ein umfangreiches Wissen über die DNA-Reparatur in *C. glutamicum* kann dazu genutzt werden diesen wichtigen Industriestamm noch weiter zu entwickeln und zu verbessern. Außerdem führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu weiteren Erkenntnissen, die beispielsweise neue Strategien im Umgang mit den eng verwandten Humanpathogenen von *C. glutamicum*, wie z.B. *C. diphtheriae*, ermöglichen.

Im Zuge dieser Arbeit sollten verschiedene Mutanten von *C. glutamicum* ATCC 13032 hergestellt werden, die in der DNA-Reparatur betroffen sind. Es wurden Gene aus jedem der bekannten Reparaturwege deletiert. Somit sollte gewährleistet werden, dass ein breites Spektrum an Mutanten erhalten wird und diese auch repräsentativ für den jeweiligen Reparaturweg sind. Außerdem sollte die Generierung von Mehrfachmutanten weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel einzelner Reparaturenzyme liefern, insbesondere wenn sich deren Funktionen überlappten. Die erhaltenen Mutanten sollten anhand verschiedener Mutagene weiter charakterisiert werden. Welcher Reparaturweg kommt bei den verschiedenen Arten von Schäden zum Einsatz? Kann ein einzelnes Enzym die Aufgabe eines anderen kompensieren? Ist die DNA-Reparatur in *C. glutamicum* ähnlich zu der in *E. coli*? Es hat sich durch Sequenzanalysen bereits gezeigt, dass *C. glutamicum* einzelne Gene fehlen, die bei der Reparatur in *E. coli* eine wichtige Rolle spielen. So ist z.B. aus dem RecBCD-Komplex nur RecB vorhanden, RecC und RecD fehlen. Welche Funktion hat RecB in *C. glutamicum*? Außerdem wurde in *C. glutamicum* die Helikase/Nuklease AdnAB gefunden. Hier war zu klären,

ob dieses Enzym, ähnlich wie AddAB in *Bacillus subtilis* (Chedin *et al.* 1998; Chedin *et al.* 2006), die Funktion von RecBCD übernehmen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme mit relevantem Genotyp

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
K12 JM109	<i>recA1, end A1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk, mk⁺), re (A1, supE44; Δ(lac-proAB), F'[tra D36, proAB, lacI^q lacZ ΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
Solu BL21	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	AMS Biotechnology (Europe) Limited
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Bröer und Krämer 1990

2.1.2 Plasmide

Die gestellten vorgefertigten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Sie dienen zum Teil als Grundlage für die Plasmide, die in dieser Arbeit neu entstanden sind (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vorgefertigte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Ursprung	Referenz
pJOE4786.1	Amp ^r , <i>lacZα</i>	pJOE773	Jeske und Altenbuchner 2010
pUC18	Amp ^r	pBR322	Vieira und Messing 1982
pk19mobsacB	Kan ^r ; mobilizable (<i>oriT, oriV</i>); <i>sacB; lacZα</i>		Schäfer <i>et al.</i> 1994
pJOE6093.7	Amp ^r , <i>rhaP_{BAD}, malE-eGFP</i>		Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE6591.24	Amp ^r , <i>rhaP_{BAD}, Strep-tag®II-eGFP</i>		Altenbuchner, unveröffentlicht

Plasmid	Eigenschaften	Ursprung	Referenz
pJOE6089.4	Amp ^r , <i>rhaP_{BAD}</i> , <i>eGFPStrep-tag</i> ^{®II}	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pGro7	Helferplasmid; Cm ^r , <i>P_{araBAD}</i> , <i>groES</i> , <i>groEL</i>		TaKaRa BIO INC.
pKJE7	Helferplasmid; Cm ^r , <i>P_{araBAD}</i> , <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>grpE</i>		TaKaRa BIO INC.

Tabelle 4: In dieser Arbeit entstandene *Knock-out*-Plasmide zur markerfreien Deletion von DNA Reparatur relevanter Gene

Plasmid	Ursprungsvektor	Insert	Primer	geschnit- -ten mit	Resistenz	Methode
pFD2 (<i>uvrD</i>)	pJOE4786.1	5' + 3'- Region <i>uvrD</i>	S8347/S8348 S8349/S8350	<i>SmaI</i>	Amp ^R	Fusions- PCR
pFD4 (<i>uvrD</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>uvrD</i> aus pFD2		<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD5 (<i>uvrA</i>)	pUC18	5' + 3'- Region <i>uvrA</i>	S8433/S8344 S8345/S8434	<i>BamHI</i>	Amp ^R	Fusions- PCR
pFD6 (<i>uvrA</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>uvrA</i> aus pFD5		<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD7 (<i>alkB</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>alkB</i>	S8456/S8457 S8458/S8459	<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD9 (<i>alkA</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>alkA</i>	S8512/S8513 S8514/S8515	<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD10 (<i>ung</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>ung</i>	S8538/S8509 S8510/S8539	<i>EcoRI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD12 (<i>mutM</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>mutM</i>	S8619/S8620 S8621/S8622	<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD13 (<i>nei</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>nei</i>	S8703/S8704 S8705/S8706	<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD14 (<i>recA</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>recA</i>	S8699/S8700 S8701/S8702	<i>XbaI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD15 (<i>nth</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>nth</i>	S8933/S8934 S8935.1/S8936	<i>BamHI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD16 (<i>tagI</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>tagI</i>	S8961/S8938 S8939/S8962	<i>XbaI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR
pFD18 (<i>mutY</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>mutY</i>	S8623/S8624 S8625/S8626	<i>SbfI</i>	Kan ^R	Fusions- PCR

Plasmid	Ursprungsvektor	Insert	Primer	geschnitten mit	Resistenz	Methode
pFD20 (<i>ogt</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>ogt</i>	S9235/S9236 S9237/S9238	<i>Xba</i> I	Kan ^R	Fusions-PCR
pFD22 (<i>recO</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>recO</i>	S9420/S9421 S9422/S9423	<i>Xba</i> I	Kan ^R	Fusions-PCR
pFD23 (<i>adnAB</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>adnAB</i>	S9577/S9578 S9579/S9580	-	Kan ^R	Gibson-Assembly
pFD25 (<i>ruvB</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>ruvB</i>	S9907/S9908 S9909/S9910	-	Kan ^R	Gibson-Assembly
pFD27 (<i>recJ</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>recJ</i>	S9614/S9615 S9616/S9617	-	Kan ^R	Gibson-Assembly
pFD28 (<i>xth</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>xth</i>	S9606/S9607 S9608/S9609	-	Kan ^R	Gibson-Assembly
pFD29 (<i>recG</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>recG</i>	S10025/S10026 S10027/S10028	-	Kan ^R	Gibson-Assembly
pFD36 (<i>recB</i>)	pk19mobsacB	5' + 3'- Region <i>recB</i>	S10562/S10563 S10564/S10565	-	Kan ^R	Gibson-Assembly

Tabelle 5: In dieser Arbeit entstandene Plasmide zur Expression von *RecJ* und *RecB*

Plasmid	Ursprungsvektor	Insert	Primer	geschnitten mit	Resistenz	Methode
pFD40 (<i>recJ</i>)	pJOE6089.4	<i>recJ</i> + Strep-tag	S10572/S10573	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Amp ^R	NEBuilder
pFD44 (<i>recB</i>)	pJOE6093.7	<i>recB</i> + MBP	S11179/S11180	<i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI	Amp ^R	NEBuilder

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) bzw. Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) erworben.

2.2.2 Enzyme

Tabelle 6: Hersteller und Verwendungszweck der eingesetzten Enzyme

Enzym	Hersteller	Verwendung
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Roche Applied Science	Klonierung und Überprüfung der konstruierten Plasmide
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Roche Applied Science	Verknüpfung kompatibler DNA-Enden
Klenow-Polymerase	Roche Applied Science	Auffüllreaktion in 5'-3'- Richtung bei blunt-end- Klonierungen
Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science	Abspaltung freier Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA
Benzonase	Sigma Aldrich	Abbau möglicher DNA- Fragmente im Protein-Eluat
High-Fidelity PCR Enzyme Mix	Thermo Scientific	PCR
Q5 High Fidelity Polymerase	New England Biolabs	PCR
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific	Kolonie-PCR
Lysozym	Amresco	Zellwandlyse
Proteinase K	Macherey-Nagel	Chromosomale DNA
<i>Gibson Assembly</i> [®] Reaktionsmix	New England Biolabs	<i>Gibson Assembly</i> [®]
<i>NEBuilder</i> [®] Reaktionsmix	New England Biolabs	<i>NEBuilder</i> [®]

2.2.3 Kits

Die Verwendung der einzelnen Kits erfolgte gemäß der jeweiligen Anleitung.

Tabelle 7: Hersteller und Zweck der verwendeten Kits

Name	Hersteller	Verwendung
NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Aufreinigung von DNA- Fragmenten aus PCR- Produkten und Agarosegelen

Name	Hersteller	Verwendung
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen	Plasmidisolierung
NucleoSpin®	Macherey-Nagel	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>
Gibson Assembly®	New England Biolabs	Klonierung
NEBuilder®	New England Biolabs	Klonierung
Strep-tag® Purification	iba	Protein-Aufreinigung
MBP Purification	New England Biolabs	Protein-Aufreinigung

2.2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 8) wurden von Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg) bezogen und in einer Konzentration von 100 µM für die PCR eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionsmutanten
 Abkürzungen: 5'R = 5'-Region; 3'R = 3'-Region; for = forward; rev = reverse

Name	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S8347	CGAGGTGGTACAGCTTTTGTT	<i>uvrD</i> / 5'R-for / Fusions-PCR
S8348	GGTACCCATTACCCAATAACCTACTAG	<i>uvrD</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8349	CTAGTAGGTTATTGGGGTAATGGGTACCTAGCCCCAATCACGG CGC	<i>uvrD</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8350	CCTGGACTCATGGGGCAA	<i>uvrD</i> / 3'R-rev / Fusions-PCR
S8433	AAAAAAGGATCCGTTGGCAGGTTCCATCTTTT	<i>uvrA</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8434	AAAAAAGGATCCATTGCTGTTGTTGGCCTTGC	<i>uvrA</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8456	AAAAAAGGATCCGAATTTCTGGAGCAATTGCAG	<i>alkB</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8457	GGTACCCACTAAAGTTCTCCTGCACAA	<i>alkB</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8458	TTGTGCAGGAGAACTTTAGTGGGTACCTAAACTCCAGGTAGA GGTAT	<i>alkB</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8459	AAAAAAGGATCCGGCTGGCTATGATCCAGAT	<i>alkB</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8460	AAAAAATCTAGAAATGCTGCCCAAGCTTCCTG	<i>recF</i> / 5'R-for + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR

Name	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S8461	GATATCCATCGGGTCTGACCTCCTT	<i>recF</i> / 5'R-rev + <i>EcoRV</i> / Fusions-PCR
S8462	AAGGAGGTCAGACCCGATGGATATCTGACAGATCCAATTGAG	<i>recF</i> / 3'R-for + <i>EcoRV</i> / Fusions-PCR
S8463	AAAAAATCTAGAGCGTGCAGCTGGGTCATAA	<i>recF</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8509	GGTACCCATCCATCGAAAAATGCGGG	<i>ung</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8510	CCGCATTTCCGATGGATGGGTACCTAAGGTATCTGATTATGT CCAG	<i>ung</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8512	AAAAAAGGATCCTGTAGGTCCAATTTGGTTGTATT	<i>alkA</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8513	GGTACCCATGGCGCGAACCATAATTTG	<i>alkA</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8514	CAAATTATGGTTCGCGCCATGGGTACCTAAGATATAACTCCGA TGACAAC	<i>alkA</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8515	AAAAAAGGATCCCGTCGTCGGCTGCGTCAC	<i>alkA</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8538	AAAAAAGAATTCTAATCACGGAGCAAGCTGGAT	<i>ung</i> / 5'R-for + <i>EcoRI</i> / Fusions-PCR
S8539	AAAAAAGAATTCCTCTCGCGCAAATGCTTTT	<i>ung</i> / 3'R-rev + <i>EcoRI</i> / Fusions-PCR
S8619	AAAAAAGGATCCTCCAATTGGATATACCCGAA	<i>mutM</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8620	GGTACCTAGCTGATGAGCGAAGCTTTT	<i>mutM</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8621	AAAAGCTTCGCTCATCAGCTAGGTACCCACGGGACTCCCGAAG CT	<i>mutM</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8622	AAAAAAGGATCCGCGAACTCACCCCAACCAA	<i>mutM</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions- PCR
S8623	AAAAAACCTGCAGGGTGGATACTTCACCAACTGTA	<i>mutY</i> / 5'R-for + <i>SbfI</i> / Fusions-PCR
S8624	GGTACCCATGACCTAAATGATTGTAC	<i>mutY</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8625	GTACAATCATTTAGGTCATGGGTACCTAAACCACTGCGCGCCT GC	<i>mutY</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8626	AAAAAACCTGCAGGGATGCTTGCCGTAGAGGTC	<i>mutY</i> / 3'R-rev + <i>SbfI</i> / Fusions-PCR
S8699	AAAAAATCTAGACTGTCAACCGCAACTACCTT	<i>recA</i> / 5'R-for + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8700	AGTACTTAAGCACCAGTTTTAACAAGC	<i>recA</i> / 5'R-rev + <i>ScaI</i> / Fusions-PCR
S8701	GCTTTGTTAAAACCTGGTGCTTAAGTACTATTTTTAATTCCTCTTA GTTTTATT	<i>recA</i> / 3'R-for + <i>ScaI</i> / Fusions-PCR
S8702	AAAAAATCTACAACCTTTGGAGAAGAATCTACTAG	<i>recA</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8703	AAAAAAGGATCCGCCTTCCTGTTTTCTGACATT	<i>nei</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8704	GGTACCCATGTCATCAGGTTAGCGC	<i>nei</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR

Name	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S8705	GCGCTAACCTGATGACATGGGTACCTGAAGCATGAGACTAATACTCA	<i>nei</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8706	AAAAAAGGATCCCAAGTGAGGTGGTGCTTC	<i>nei</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8933	AAAAAAGGATCCGAAGCGGTTAGCCAGCTGC	<i>nth</i> / 5'R-for + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8934	GTTAACCATACCCTTAAGTTAGCGCG	<i>nth</i> / 5'R-rev + <i>HpaI</i> / Fusions-PCR
S8935.1	CGCGCTAACTTAAGGGTATGGTAACTAGAAAACAAATGACAA GCACT	<i>nth</i> / 3'R-for + <i>HpaI</i> / Fusions-PCR
S8936	AAAAAAGGATCCGTTTCCGCACCGTCCAGC	<i>nth</i> / 3'R-rev + <i>BamHI</i> / Fusions-PCR
S8961	AAAAAATCTAGAAGAAAACGATGGCGGTGGAA	<i>tagI</i> / 5'R-for + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8938	GGTACCCATGGATTCTCCTTGGGGC	<i>tagI</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8939	GCCCCAAGGAGAATCCATGGGTACCTTAGGAAATCAGCCAGT CGTTT	<i>tagI</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S8962	AAAAAATCTAGAGCGGCTTCGATTGCAACGTT	<i>tagI</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8964	AAAAAATCTAGATCTGTGGTGTAACCAGGGC	<i>xth</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S8978	AACAGCTAGGGTATAAGTCATGGATATCTAACTGCGTATGATC TTTCAG	<i>xth</i> / 3'R-for + <i>EcoRV</i> / Fusions-PCR
S9235	AAAAAATCTAGAAGGCACGCCGGCGTTGA	<i>ogt</i> / 5'R-for + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S9236	GGTACCTAGTTTGTGTCCGCGCACG	<i>ogt</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S9237	CGTGCGCGGACACAACTAGGTACCCATTTTTCAAGTCCTCTTT ATAC	<i>ogt</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S9238	AAAAAATCTAGACATGATCTGCTAGTCCACATT	<i>ogt</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S9420	AAAAAATCTAGACAGTAAGCGGCGTGTCGG	<i>recO</i> / 5'R-for + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S9421	GGTACCTAGTGCTTAGGCTTAGGCGT	<i>recO</i> / 5'R-rev + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S9422	ACGCCTAAGCCTAAGCACTAGGTACCCATGAACTACCCCCTT AAAG	<i>recO</i> / 3'R-for + <i>KpnI</i> / Fusions-PCR
S9423	AAAAAATCTAGACCTGATGGCTTCCGCTCC	<i>recO</i> / 3'R-rev + <i>XbaI</i> / Fusions-PCR
S9577	CGACCTGCAGGCATGGTAATGGTCGCGCTGATAAG	Gibson Assembly / <i>adnAB</i> / 5'R-for
S9578	GCGCATCACATACCTCAAATCTTGTCAGAAAC	Gibson Assembly / <i>adnAB</i> / 5'R-rev
S9579	GAGGTATGTGATGCGCCTAAGATCAAAC	Gibson Assembly / <i>adnAB</i> / 3'R-for
S9580	GTACCCGGGGATCCTGGGCTCTACAGTTTCTGC	Gibson Assembly / <i>adnAB</i> / 3'R-rev
S9606	GCCTGCAGGTCGACTTTGTTGCACGTCGCCGGA	Gibson Assembly / <i>xth</i> / 5'R-for

Name	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S9607	CGCAGTTACATGACTTATACCCTAGCTGTTTTGGATTTAG	Gibson Assembly / <i>xth</i> / 5'R-rev
S9608	TAAGTCATGTAAGTGCATGATCTTTTCAG	Gibson Assembly / <i>xth</i> / 3'R-for
S9609	GTACCCGGGGATCCTTCTGTGGTGTAACCAGGG	Gibson Assembly / <i>xth</i> / 3'R-rev
S9614	GCCTGCAGGTCGACTGCGCTGCAGATTAAGTCC	Gibson Assembly / <i>recJ</i> / 5'R-for
S9615	CCAAGCTACAATCGTAAAATAGTACTAGATATATTTTACTC	Gibson Assembly / <i>recJ</i> / 5'R-rev
S9616	TTACGATTGTAGCTTGGTTGCATAAGCAC	Gibson Assembly / <i>recJ</i> / 3'R-for
S9617	GTACCCGGGGATCCTGTAGTGACCCAGTGGCTC	Gibson Assembly / <i>recJ</i> / 3'R-rev
S9907	GCCTGCAGGTCGACTGAATGGTGCCTGCTGATT	Gibson Assembly / <i>ruvB</i> / 5'R-for
S9908	CCGATGTGTAGCCACCTTAGGTGGCC	Gibson Assembly / <i>ruvB</i> / 5'R-rev
S9909	GGTGGCTACACATCGGACATGAGGGTC	Gibson Assembly / <i>ruvB</i> / 3'R-for
S9910	GTACCCGGGGATCCTGTAATGGTGCCTGATAAG	Gibson Assembly / <i>ruvB</i> / 3'R-rev
S10025	GCCTGCAGGTCGACTACTCCGCGCAAACACTCG	Gibson Assembly / <i>recG</i> / 5'R-for
S10026	ATCAATATCACATGTGGCTACTCCACTCC	Gibson Assembly / <i>recG</i> / 5'R-rev
S10027	GCCACATGTGATATTGATAGGGTTAAGTCATGAAG	Gibson Assembly / <i>recG</i> / 3'R-for
S10028	GTACCCGGGGATCCTCGTTCTGCGACGGTGAAC	Gibson Assembly / <i>recG</i> / 3'R-rev
S10562	GCCTGCAGGTCGACTCCTCCAACAGGGGGCCC	Gibson Assembly / <i>recB</i> / 5'R-for
S10563	CTAGGCTACATAATGATCACCTACTTTAACGGCTTCAGG	Gibson Assembly / <i>recB</i> / 5'R-rev
S10564	GATCATTATGTAGCCTAGTCGTGAGTCAG	Gibson Assembly / <i>recB</i> / 3'R-for
S10565	GTACCCGGGGATCCTCTTCTCAACGGCTTCGC	Gibson Assembly / <i>recB</i> / 3'R-rev

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide
 Abkürzungen: for = *forward*; rev = *reverse*

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S10570	CTTAAGAAGGAGATATACATATGACCAGCCCAGTTGAAAAC	Gibson Assembly / <i>recB</i> +pJOE6089.4/ for
S10571	TGCGGATGGCTCCAGGATCCGTCTGCTGTACTGCCAGG	Gibson Assembly / <i>recB</i> +pJOE6089.4/ rev
S10572	CTTAAGAAGGAGATATACATATGACCGTTACCTCACCAG	Gibson Assembly / <i>recJ</i> +pJOE6089.4/ for
S10573	TGCGGATGGCTCCAGGATCCGATAACTGTGCACGCAGAG	Gibson Assembly / <i>recJ</i> +pJOE6089.4/ rev
S11179	AAAAAAGGATCCACCAGCCCAGTTGAAAACGTT	<i>Fusion RecB+MBP</i> for
S11180	AAAAAAAAGCTTAGTCTGCTGTACTGCCAGGC	<i>Fusion RecB+MBP</i> rev

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide zum Aktivitätsnachweis von RecJ und RecB

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Gen/Richtung/Zweck
S11062	GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC TGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCG	Substrat-DNA für Nachweis der Nukleaseaktivität
S11063	CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT TACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC	Substrat-DNA für Nachweis der Nukleaseaktivität, <i>blunt-end</i>
S11064	TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCA TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGA	Substrat-DNA für Nachweis der Nukleaseaktivität, 3'-Überhang
S11065	GTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC TGATAATTCTTACTGTCATGCCATC	Substrat-DNA für Nachweis der Nukleaseaktivität, 5'-Überhang
S11177	GACGTGGGCAAAGGTTTCGTCATGGACTGACAGCTGCATGG	Y-Duplex mit 18 nt Verlängerung am 5'-Ende
S11177*5	FITC +GACGTGGGCAAAGGTTTCGTCATGGACTGACAGCTGC ATGG	Y-Duplex mit 18 nt Verlängerung am 5'-Ende, FITC-markiert am 5'-Ende
S11177*3	GACGTGGGCAAAGGTTTCGTCATGGACTGACAGCTGCATG +FITC	Y-Duplex mit 18 nt Verlängerung am 5'-Ende, FITC-markiert am 3'-Ende
S11178	GCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGCTTA TACATCTATCTCTTGACTC	Y-Duplex mit 40 nt Verlängerung am 3'-Ende
S11178*5	FITC +GCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACT GCTTATACATCTATCTCTTGACTC	Y-Duplex mit 40 nt Verlängerung am 3'-Ende, FITC-markiert am 5'-Ende
S11178*3	GCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGCTTA TACATCTATCTCTTGACTC +FITC	Y-Duplex mit 40 nt Verlängerung am 3'-Ende, FITC-markiert am 3'-Ende
S11215	ACTTCTTACGTTCCGCGCCGACAGCCTCGATCCAAGCGC GATGTGGGCAAAGGTTTCGTCATGGACTGACAGCTGCATGG	Y-Duplex mit 58 nt Verlängerung am 5'-Ende
S11796	CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGACGAACCTTTGCCACGTC	Nachweis der Nukleaseaktivität ohne Y-Struktur
S11796*5	FITC +CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGACGAACCTTTGCCACG TC	Nachweis der Nukleaseaktivität ohne Y-Struktur, FITC-Markierung am 5'- Ende
S11796*3	CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGACGAACCTTTGCCACGTC +FITC	Nachweis der Nukleaseaktivität ohne Y-Struktur, FITC-Markierung am 3'- Ende
S12013	CGATC +FITC	DNA-Standard zur Größenbestimmung

2.2.5 Medien

Zur Kultivierung und Transformation von *E. coli*:

LB-Medium (pH 7,2)	Trypton	10,0 g
	Hefextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
LB-Agar	LB-Medium	400 ml
	Euroagar	6,4 g
TY-Medium	Trypton	5,0 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	H ₂ O	ad 0,5 l
Glycerinkulturmedium	Glycerin (86 % v/v)	57,5 ml
	TY-Medium	42,5 ml
Transformation and Storage Solution (TSS-Medium)	LB-Medium (pH 6,5)	82,5 ml
	PEG 6000	10,0 g
	DMSO	5,0 ml
	MgCl ₂ (2 M)	2,5 ml

Zur Kultivierung und Transformation von *C. glutamicum*:

Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium	BHI	37,0 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
BHI-Agar	BHI-Medium	400,0 ml
	Euroagar	6,4 g

BHIS-Medium (Brain-Heart-Infusion + Sorbitol)	BHI	37,0 g
	D-Sorbit	91,0 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
BHIS-Agar	BHIS-Medium	400 ml
	Euroagar	6,4 g

2.2.6 Antibiotika und andere Medienzusätze

Tabelle 11: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50% Ethanol	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in Ethanol	5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in 0,1 M NaOH	50 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml in H ₂ O	0,4 - 2 µg/ml

Tabelle 12: Verwendete Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG	100 mM in 50 % Ethanol	250 µM
X-Gal	40 mM in DMF	40 µg/ml
D-Saccharose	60% in H ₂ O	10 %
L-Rhamnose	20% in H ₂ O	0,2 %
L-Arabinose	2% in H ₂ O	0,05 %
D-Sorbit	-	0,9 %

2.2.7 Puffer und Lösungen

TE 10.01	TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (pH 8)	10 mM
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,1 mM
50x TAE	TRIS	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	18,6 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
10x DNA-Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Xylencyanol	0,5 g
	Bromphenolblau	0,5 g
	Glycerin (86 % v/v)	116,3 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	ad 200,0 ml
Agarosegel (1 %)	1x TAE	150,0 ml
	Ethidiumbromid	3,0 µl
	LE-Agarose	1,5 g
Enzymatischer Lysepuffer zur Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>	TRIS/HCl (pH 8,0)	2 mM
	EDTA (pH 8)	2 mM
	Triton X-100	1 %
	Lysozym	20 mg/ml

Puffer und Lösungen für die *Biofeedback*-Plasmidisolierung

Resuspensionspuffer	D-Glukose	9,9 g
	TRIS/HCl (1 M, pH 8)	25,0 ml
	EDTA (pH 8)	3,72 g
	H ₂ O	ad 1,0 l

Lysepuffer	NaOH (2 M)	0,84 ml
	SDS (10 % w/v)	0,84 ml
	H ₂ O	6,72 ml
Neutralisationspuffer	NH ₄ -Acetat	289,65 g
	H ₂ O	500 ml

Puffer für die Affinitätschromatographie über Strep[®]-Tag

Puffer W (Waschpuffer)	TRIS/HCl (pH 8)	100 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM

Puffer E (Elutionspuffer)	TRIS/HCl (1 M, pH 8)	100 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM
	Desthiobiotin	2,5 mM

Puffer R (Regenerationspuffer)	TRIS/HCl (1 M, pH 8)	100 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM
	Hydroxy-Azophenyl- Benzoessäure (HABA)	1 mM

Puffer für die Affinitätschromatographie über MalE

Waschpuffer	NaPP (pH 7)	100 mM
	NaCl	200 mM

Elutionspuffer	NaPP (pH 7)	100 mM
	NaCl	200 mM
	Maltose	10 mM

Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

SDS-PAGE Sammelgel (3 %)	TRIS/HCl (0,5 M, pH 6,8)	625,0 µl
	H ₂ O	1,5 ml
	SDS (10 % w/v)	25,0 µl
	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (AMBA)	353,0 µl
	APS (10 %)	25,0 µl
	Tetramethylethylenediamin (TEMED)	2,5 µl
	SDS-PAGE Trenngel (10 %)	TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8)
	H ₂ O	3,35 ml
	SDS (10 % w/v)	100 µl
	AMBA	4,0 ml
	APS (10 %)	50,0 µl
	TEMED	5,0 µl
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant-Blau R-250	2,0 g
	Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,5 g
	Ethanol	425,0 ml
	Methanol	50,0 ml
	Eisessig	100,0 ml
	H ₂ O	ad 1,0 l
Entfärbelösung	Ethanol	450,0 ml
	Eisessig	100,0 ml
	H ₂ O	450,0 ml

5x SDS-Auftragspuffer	TRIS	0,6057 g
	EDTA (0,5 M)	0,4 ml
	SDS (20 % w/v)	5 ml
	β-Mercaptoethanol (reinst)	1 ml
	Glycerin (86 % v/v)	10 ml
	Bromphenolblau (1 %)	2 ml
	H ₂ O	ad 20 ml

10x SDS-Laufpuffer	TRIS	30,0 g
	Glycin	144 g
	SDS (20 % w/v)	50,0 ml
	H ₂ O	ad 1,0 l

Puffer und Lösungen für die native PAGE

25 x TBE	TRIS	303,75 g
	Borsäure	128,3 g
	EDTA	9,3 g
	H ₂ O	1,0 l

9 %iges natives Polyacrylamid-Gel	AMBA	6,0 ml
	25 x TBE	0,8 ml
	H ₂ O	13,0 ml
	APS (10 %)	0,2 ml
	TEMED	10,0 µl

15 %iges natives Polyacrylamid-Gel	AMBA	10,0 ml
	50 x TAE	400,0 µl
	H ₂ O	9,4 ml
	APS (10 %)	200,0 µl
	TEMED	10,0 µl

Puffer und Lösungen für den Nachweis der Protein-Aktivität

Hybridisierungspuffer	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	EDTA (pH 8)	0,1 mM
	NaCl	100 mM
NEBuffer™ 2 (10 x, pH 7,9) (New England Biolabs)	NaCl	50 mM
	Tris-HCl	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	DTT	1 mM
T4 DNA-Ligase-Puffer (10 x, pH 7,8) (Thermo Scientific)	Tris-HCl	400 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	100 mM
	ATP	5 mM

2.3 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

2.3.1 *Escherichia coli*

Die Kultivierung der Stämme erfolgte bei 37 °C in flüssigem LB-Medium oder entsprechend auf LB-Agar-Platten. Für die Übernachtskulturen (ÜNK) von *E. coli* wurden 5 ml LB₀ (bei plasmidtragenden Stämmen mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt) mit einer Einzelkolonie steril angeimpft und ca. 16 h gerollert. Die Aufbewahrung der Stämme auf Agarböden erfolgte bis zu 4 Wochen (im Kühlschrank bei 6 °C). Zur längeren Verwendung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden die ÜNK abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT) und die Zellpellets in 2 ml Glycerinkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 2 2 ml-Gefriererörchen aliquotiert und bei -70 °C eingefroren.

2.3.2 *Corynebacterium glutamicum*

Stämme von *C. glutamicum* wurden bei 30 °C inkubiert. Die Kultivierung erfolgte auf BHI-, BHIS- oder LB-Medium. Zur Anzucht von ÜNK wurden die 5 ml-Kulturen auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die bewachsenen Agarplatten wurden bis zu 4 Wochen bei 6 °C

aufbewahrt. Zur langfristigen Lagerung wurden Dauerkulturen (wie *E. coli*) hergestellt und bei -70 °C gelagert.

Im Photometer wurde die Zunahme der Zelldichte durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Je nach Experiment wurden die Kulturen bis zu einer bestimmten OD inkubiert. Die genauen Werte können den Kapiteln zu den einzelnen Versuchen entnommen werden.

2.4 Transformationsmethoden

2.4.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen (meist JM109) mit Plasmid-DNA erfolgte mittels TSS-Hitzeschock-Methode (Chung *et al.* 1989). Dazu wurden 25 ml LB_0 1:100 mit einer ÜNK von JM109 angeimpft. Die Kultur (300 ml Glaskolben ohne Schikane) wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,4 auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen überführt und bei Raumtemperatur 10 Minuten (4.500 rpm) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml TSS-Medium resuspendiert und auf Eis abgekühlt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden zu etwa 200 ng gereinigter Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Nach weiterer Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock. Dafür wurden die Transformationsansätze für 90 s bei 42 °C im Wasserbad gehalten und danach sofort wieder auf Eis abgekühlt. Bei diesem Vorgang sollen kurzfristig Poren in der Zellmembran entstehen, welche die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglichen. Im nächsten Schritt wurde der Transformationsansatz zu 2 ml LB_0 -Medium in ein Glasröhrchen überführt und eine weitere Stunde bei 37 °C auf dem Roller inkubiert. Im Fall von Transformation von Plasmid-DNA wurden 100 µl der Kultur auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Wurde ein Ligationsansatz transformiert, wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) und das Pellet (nach Verwerfen des Überstandes) in der Restflüssigkeit im Röhrchen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann vollständig auf LB-Agar-Nährböden mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Zur Kontrolle wurde mit einem Ansatz ohne DNA ebenso verfahren.

Transformation von *E. coli* SoluBL21™

Abweichend zum oben beschriebenen Verfahren zur Transformation von *E. coli* wurden bei der Transformation des Stammes SoluBL21™ (Genlantis, USA) ca. 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Außerdem erfolgt die Inkubation auf Eis nur für 15 min. Der anschließende Hitzeschock entfällt. Nach 1 h Rollern bei 37 °C wird der Transformationsansatz abzentrifugiert und das gesamte Pellet auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.4.2 Transformation von *C. glutamicum* (modifiziert Kirchner und Tauch 2003)

2.4.2.1 Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum* Zellen wurden zunächst 5 ml BHI-Medium im Glasröhrchen mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* steril angeimpft. Nach 6 h Inkubation bei 30 °C auf dem Schüttler, wurde diese Vorkultur vollständig in 50 ml BHIS (500 ml-Kolben mit Schikane) überführt und über Nacht bei 30 °C weiter kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml dieser ÜNK wiederum in 250 ml BHIS (2 L-Kolben mit Schikane) überimpft und diese Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1,75 weiter inkubiert (ca. 5 h, 30 °C, Schüttler, 200 rpm). Die Zellen wurden dann auf zwei vorgekühlte GSA-Becher verteilt und abzentrifugiert (Sorvall RC 5B Plus Kühlzentrifuge, GSA-Festwinkelrotor, 5.000 rpm, 20 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden anschließend mit je 20 ml 10 %iger eiskalter Glycerinlösung resuspendiert und in ebenfalls vorgekühlte SS-34-Zentrifugationsröhrchen überführt. In 3 Zentrifugationsschritten (5.000 rpm, 4 °C) wurden die Zellen mit je 20 ml 10 %iger Glycerinlösung (kalt) gewaschen. Die Zentrifugationszeit wurde in jedem Schritt 2 min verlängert und erfolgte für 15, 17 und 19 min. Nach der letzten Zentrifugation wurden die gewonnenen Zellpellets in 800 µl Glycerinlösung (10 %, eiskalt) resuspendiert und in 150 µl-Aliquots auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) verteilt. Die Aliquots der elektrokompetenten Zellen wurden bei -70 °C eingefroren und erst kurz vor Verwendung auf Eis aufgetaut.

2.4.2.2 Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum*

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurden zunächst die zu transformierenden Plasmide entsalzt. Dazu wurde die gewünschte Menge (meist 5 bis 10 µl) des Plasmids auf eine Micro

Pore Membran (Millipore) pipettiert und 20 min in einer mit sterilem H₂O befüllten Petrischale gehalten. Anschließend wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und das entsalzte Plasmid vorsichtig von der Membran abpipettiert und durch langsames Auf- und Abpipettieren mit den Zellen gemischt. In der Zwischenzeit wurde BHIS-Medium auf 46 °C erwärmt und 4 ml davon in einem Glasröhrchen vorgelegt. Nach 5 bis 15 min auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Durch leichtes Klopfen auf eine weiche Unterlage wurde sichergestellt, dass sich der Ansatz auf dem Boden der Küvette befindet. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Die Zeitkonstante sollte etwa 3,5 – 4,0 ms betragen. Direkt nach dem Puls wurde sofort 1 ml vorgewärmtes BHIS-Medium zu den Zellen gegeben, der Ansatz vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und zu den vorgelegten 4 ml BHIS in das Glasröhrchen gegeben. Im nächsten Schritt wurde der Transformationsansatz für 6 min bei 46 °C im Wasserbad und anschließend bei 30 °C für 1 h auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Zellernte im Zentrifugenglasröhrchen erfolgte mit 4.500 rpm bei RT (5 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in der zurückgebliebenen Restflüssigkeit resuspendiert und vollständig auf BHIS-Nährboden mit Antibiotikum (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Nach 2 Tagen bei 30 °C waren die Kolonien gewachsen.

2.5 Molekulargenetische Methoden

2.5.1 Plasmidisolierung

Um Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad, wie man ihn für Klonierungen oder die Transformation benötigt, zu erhalten, wurde der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ verwendet. Dazu wurde eine ÜNK von JM109 mit 5 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt und das Plasmid nach Anweisungen des Herstellers isoliert.

Die Biofeedback-Plasmidisolierung (Lee und Rasheed 1990) dient als kostengünstige Alternative und wurde bei der Überprüfung von Klonierungen angewendet. Aus einer 2 ml-ÜNK wurden die *E. coli* Zellen pelletiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Durch die Zugabe von 300 µl Lysepuffer folgte der Aufschluss der Zellen. Hierzu wurden die Ansätze durch Invertieren vorsichtig

gemischt. Nach max. 5 min wurde die Zellyse mittels 400 µl Neutralisierungslösung gestoppt. Auch in diesem Schritt wurden die lysierten Zellen durch Kippen der Reaktionsgefäße gemischt. Um Zellreste, denaturierte Proteine und chromosomale DNA zu sedimentieren wurden die Ansätze zentrifugiert (Tischzentrifuge VWR, 13.200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurden etwa 800 µl des Überstandes vorsichtig abpipettiert und zu 700 µl Isopropanol in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei RT gefällt und das Plasmid-Pellet nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge VWR, 13.200 rpm, 10 min, RT) mit 150 µl 100 % Ethanol gewaschen (13.200 rpm, 3 min, RT). Um die Trocknungszeit zu verkürzen wurde nach der Zentrifugation der Ethanol-Überstand abgekippt und die Reaktionsgefäße kopfüber auf Zellstoff abgetropft. Das getrocknete Pellet wurde dann in 100 µl H₂O resuspendiert. Für die weitere Analyse wurden 3 µl der isolierten Plasmid-DNA in einem Restriktionsverdau eingesetzt.

2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Corynebacterium glutamicum*

Zur Isolierung der chromosomalen DNA wurde zunächst eine ÜNK von *C. glutamicum* (5 ml, LB₀) bei RT abzentrifugiert (Hereaus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min). Das erhaltene Pellet wurde in 180 µl Enzymatischem Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert und die Suspension 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl Proteinase K (0,2 mg/µl) wurde der Ansatz auf dem Vortexer gemischt und 2 h bei 56 °C unter Schütteln auf dem Thermomix inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 200 µl Puffer B3 (NucleoSpin® Kit von Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) versetzt und sorgfältig gemischt. Einer weiteren Inkubation für 10 min bei 70 °C folgte die Sedimentation (5 min, 13.200 rpm, RT). Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass der Überstand klar ist. Gegebenenfalls wurde dieser in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand mit 210 µl 100 % Ethanol gemischt und auf eine Säule (NucleoSpin® Kit von Macherey-Nagel) überführt. Die darauf folgende Zentrifugation (11.000 g, 1 min, Tischzentrifuge VWR) wurde so oft wiederholt, bis der gesamte Ansatz den Filter passiert hat. Nach Verwerfen des Durchflusses und 2 Waschschritten (11.000 g, 1 min) mit Puffer BW bzw. B5 (NucleoSpin® Kit von Macherey-Nagel) wurde die Säule nochmals trocken abzentrifugiert (1 min, 11.000 g). Zum Aufbewahren des Eluates wurde die Säule zum Schluss in ein 2 ml-

Gefäß mit Schraubverschluss überführt und die DNA mit 50 µl vorgewärmtem (70 °C) Puffer BE (NucleoSpin® Kit von Macherey-Nagel) eluiert (1 min, 11.000 g).

2.5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zur Amplifikation chromosomaler DNA, zur Kontrolle von Deletionen und zur Klonierung wurden verschiedene PCRs durchgeführt. Je nach weiterer Verwendung des Amplifikats wurden unterschiedliche Polymerasen gewählt. Wurde das Fragment beispielsweise für eine anschließende Klonierung benötigt, kamen der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ oder die „Q5-DNA-Polymerase“ zum Einsatz. Diese Enzyme verfügen über eine Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) und entfernen falsch eingebaute Nukleotide durch ihre eigene 3'→5'-ExoNukleaseaktivität, wodurch eine weitgehend fehlerfreie Amplifikation gewährleistet wird. Um lediglich Deletionen oder chromosomale Insertionen nachzuweisen, wurde keine *proof-reading*-Aktivität benötigt. Für die PCR wurde in diesem Fall die „*DreamTaq* DNA Polymerase“ eingesetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzungen und Bedingungen für die verschiedenen PCRs.

Reaktionsansatz und Programm der durchgeführten PCRs mit *High Fidelity* Polymerase

High Fidelity

<u>Ansatz:</u>	39,5 µl H ₂ O	<u>Programm:</u>	2 min	94 °C	Denaturierung	
	2,5 µl DMSO*		1 min	92 °C	Denaturierung	} 30x
	0,5 µl Template DNA (ca. 25 ng)		1 min	x °C	Primer-Annealing	
	1 µl dNTP-Mix (10 mM)		x min	72 °C	Elongation	
	5 µl 10xPuffer		10 min	72 °C	finale Elongation	
	0,5 µl <i>forward</i> -Primer (1 µM)					
	0,5 µl <i>reverse</i> -Primer (1 µM)					
	0,5 µl Enzymmix					

Reaktionsansatz und Programm der durchgeführten PCRs mit Q5 Polymerase

Q5-Polymerase

<u>Ansatz:</u>	39,5 µl H ₂ O	<u>Programm:</u>	2 min	94 °C	Denaturierung	
	2,5 µl DMSO*		1 min	92 °C	Denaturierung	} 30x
	0,5 µl Template DNA (ca. 25 ng)		1 min	x °C	Primer-Annealing	
	1 µl dNTP-Mix (10 mM)		x min	72 °C	Elongation	
	5 µl 10xPuffer		10 min	72 °C	finale Elongation	
	0,5 µl <i>forward</i> -Primer (1 µM)					
	0,5 µl <i>reverse</i> -Primer (1 µM)					
	0,5 µl Enzymmix					

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte im Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland). Die Annealing-Temperatur war abhängig von den eingesetzten Primern und wurde etwa 3°C oberhalb der gemeinsamen Schmelztemperatur des verwendeten Oligonukleotidpaares gewählt. Auch die Elongationszeit ist variabel und richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (20 bis 30 s pro kb).

*DMSO setzt die Dielektrizitätskonstante des Wassers herab und kommt bei GC-reichen Sequenzen zum Einsatz.

2.5.3.1 Kolonie-PCR

Um chromosomale Modifikationen wie eine Deletion nachzuweisen, wurde diese schnelle und kostengünstige Methode angewandt. Hierbei musste die DNA nicht erst aufwendig gereinigt werden. Es wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze ausreichend Zellmaterial von LB-Agarplatten der zu untersuchenden Klone abgeschabt und am Boden eines 1,5 ml-Reaktionsgefäßes abgestreift. Zu den Zellen wurden 100 µl H₂O pipettiert und die Zellsuspensionen etwa 10 s lang gevortext. Um die Zellen aufzubrechen wurden sie zunächst für 30 min bei -70 °C eingefroren und im Anschluss daran sofort für 10 min bei 95 °C gekocht. Im nächsten Schritt wurden die Proben zentrifugiert (13.200 rpm, 10 min) und 20 µl der Überstände in die Kolonie-PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz und Programm der durchgeführten PCRs mit Dream Taq-Polymerase

DreamTaq-Polymerase

<u>Ansatz:</u>	39,5 µl H ₂ O	<u>Programm:</u>	2 min 94 °C Denaturierung	
	2,5 µl DMSO		1 min 92 °C Denaturierung	} 30x
	0,5 µl Template DNA (ca. 25 ng)		1 min x °C Primer-Annealing	
	1 µl dNTP-Mix (10 mM)		x min 72 °C Elongation	
	5 µl 10xPuffer		10 min 72 °C finale Elongation	
	0,5 µl <i>forward</i> -Primer (1 µM)			
	0,5 µl <i>reverse</i> -Primer (1 µM)			
	0,5 µl Enzymmix			

2.5.3.2 Fusions-PCR

Zur Fusionierung zweier unabhängig voneinander amplifizierter DNA-Fragmente wurde die sog. Fusions-PCR durchgeführt. Die zirka 1000 bp langen Fragmente wurden zunächst aufgereinigt und konnten aufgrund homologer Enden in einer zweiten PCR miteinander fusioniert werden. Dazu wurden die beiden PCR-Fragmente gemischt und ohne zusätzliche Primer durch 10 Zyklen der PCR fusioniert. Dann wurden die „äußeren“ Primer (5′R-*for* und 3′R-*rev*) aus den ersten PCR-Reaktionen zugegeben und das fusionierte Fragment amplifiziert. Eine genauere Beschreibung der Fusions-PCR und der verwendeten Primer ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Reaktionsansätze und Programme der durchgeführten Fusion-PCRs mit High Fidelity Polymerase

Fusions-PCR mit High Fidelity Polymerase

<u>Ansatz:</u>	39,5 µl H ₂ O	<u>Programm:</u>	2 min 94 °C Denaturierung	} 10x
	2,5 µl DMSO		1 min 92 °C Denaturierung	
	2 x 0,5 µl Template DNA		1 min x °C Primer-Annealing	
	1 µl dNTP-Mix (10 mM)		1 min 72 °C Elongation	
	5 µl 10xPuffer		10 min 72 °C finale Elongation	
	0,5 µl Enzymmix			

Im Anschluss:

<u>Ansatz:</u>	Zugabe von je 0,5 µl der	<u>Programm:</u>	2 min 94 °C Denaturierung	} 25x
	„äußeren“ Primer		1 min 92 °C Denaturierung	
			1 min x °C Primer-Annealing	
			1,5 min 72 °C Elongation	
			10 min 72 °C finale Elongation	

2.5.4 Agarosegelelektrophorese

Entsprechend ihrer Größe können bei einer Agarosegelelektrophorese DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols. Ladungs-, Massen- und Konformationseffekte führen zu unterschiedlichem Laufverhalten im Gel und lassen so Rückschlüsse vor allem auf die Größe des untersuchten Fragments zu. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden 1- oder 2 %ige (für Fragmente < 100 bp) Agarosegele hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge LE-Agarose (Biozym) mit 1x TAE-Puffer aufgekocht und unter Rühren langsam abgekühlt. In die noch flüssige Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid (ca. 0,4 µg/ml) zugegeben und das Gel in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine Gelkammer (gefüllt mit 1x TAE + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) gelegt und der Kamm vorsichtig entfernt. Bei großen Gelen (150 ml) wurde eine Spannung von 100 – 120 V (\cong 7 Volt/cm), bei kleinen Gelen (60 ml) 80 – 100 V (\cong 7 Volt/cm) angelegt. Die Dauer der Elektrophorese betrug ungefähr 75 min.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die DNA mit 10x Auftragspuffer versetzt. Als Größenstandard diente der 1 kb –Marker von invitrogen bzw. der 100 bp-Marker von NEB.

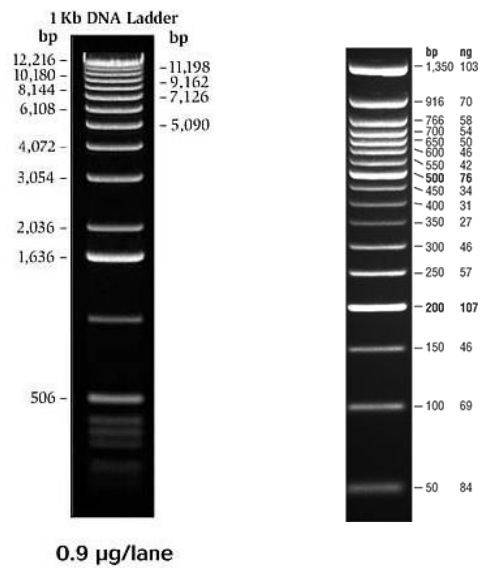


Abbildung 14: 1 kb-Größenmarker von invitrogen, 100 bp-Größenmarker von New England Biolabs

2.5.5 Reinigung von PCR-Fragmenten und DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel und nach PCR erfolgte über das PCRclean up and gel purification Kit von Macherey-Nagel und wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zur Gelextraktion wurde die entsprechende Bande auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und mit 200 µl NTI-Puffer aus dem Kit für 10 min bei 60 °C unter Schütteln auf dem Thermomix inkubiert. Sobald das Gel gelöst war wurde der Ansatz auf die Säule überführt. Bei der Elution aus Agarosegelen war darauf zu achten, dass das Agarosegel und der Laufpuffer frisch waren und die gewünschte DNA-Bande nicht zu großzügig aus dem Gel geschnitten wurde. Zu große Agarosegel-Mengen verhinderten den vollständigen Durchfluss der Probe durch das Säulenmaterial und führten so zum Verlust der DNA.

2.5.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde hauptsächlich mithilfe des NanoPhotometer® (Implen GmbH, München) bestimmt. Hierfür wurden 3 µl der Probe analysiert. Als Referenz diente der jeweilige Elutionspuffer.

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der DNA-Konzentration ist der Vergleich der DNA-Bande mit der Bande des verwendeten DNA-Standards bei der Agarosegelelektrophorese. Die in dem Marker enthaltene definierte DNA-Konzentration lässt durch Vergleichen der Signal-Intensität eine ungefähre Bestimmung der DNA-Konzentration zu. Allerdings ist diese Methode nicht sehr genau.

2.5.7 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Zum Verdau von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurden zwischen 0,2 und 0,5 µg der DNA eingesetzt. Bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl (ad 10 µl H₂O) erfolgte die Zugabe von 1 µl Restriktionsenzym und 1 µl 10x Restriktionspuffer. Der geeignete Puffer konnte dem NEB-Katalog entnommen werden. Sofern nicht anders aufgeführt, wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 1 h inkubiert. Wenn möglich, wurde die Aktivität des verwendeten Restriktionsenzym durch Hitze inaktiviert (20 min, 80/65 °C). Nicht alle Enzyme ließen sich auf diese Weise inaktivieren und mussten durch eine Isopropanolfällung wieder aus dem Ansatz entfernt werden.

2.5.8 Isopropanolfällung

Die Isopropanolfällung diente hauptsächlich der Aufreinigung von DNA nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen. Um die Enzyme und deren Puffer von der DNA zu trennen, wurde der Reaktionsansatz mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 6,2) und 1 Volumen Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation (Tischzentrifuge VWR, 3 min, 13.200 rpm, RT) pelletiert. In einem nächsten Schritt wurde das DNA-Pellet mit 10 µl 100 % Ethanol gewaschen (Tischzentrifuge VWR, 3 min, 13.200 rpm, RT), bei RT luftgetrocknet und in 8 µl H₂O wieder aufgenommen. Die so aufgereinigte DNA konnte dann weiter für die Klonierung eingesetzt werden.

2.5.9 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Um bei DNA-Klonierungen eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA nach der Restriktion mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt. Die Phosphatase spaltet die 5'-Phosphatgruppe linearisierter DNA ab, wodurch eine Religation verhindert wird.

Nach Restriktion, Fällung der DNA und Resuspendierung in frischem TE10.01, wurden 1 µl des Enzyms (20 U/µl) und 1 µl 10x Phosphatpuffer (pH 8) zu 8 µl DNA pipettiert. Die Behandlung erfolgte für 45 min bei 37 °C.

2.5.10 Behandlung mit Klenow-Enzym

DNA-Fragmente, die für *blunt end*-Ligationen, also Ligationen über glatte Enden, verwendet werden sollten, wurden mit dem Klenow-Enzym behandelt. Überstehende 5'-Enden werden hierbei mit dNTPs aufgefüllt. Diese Untereinheit der Polymerase I aus *E. coli* verfügt über eine 5'-3'-Polymeraseaktivität, sowie eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Die ursprünglich ebenfalls vorliegende 5'-3'-Exonukleaseaktivität wurde durch die Abspaltung eines kleinen Aminoterminalen Bereichs entfernt, so dass das 5'-Ende nicht abgebaut werden kann. Die Inkubation der DNA mit 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl), 1 µl 10x Restriktionspuffer B (Roche), evtl. 1 µl 10 mM dNTP-Mix (ad. 10 µl H₂O) erfolgte für 20 min bei 37 °C.

2.5.11 Ligation

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase erfolgte die Ligation von Vektor- und Insert-DNA. Dazu wurde ein 3:1-Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA eingesetzt, welches anhand von Agarosegelbildern abgeschätzt wurde. Je Ansatz (10 µl) wurden 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl) und 1 µl 10x Ligasepuffer zur DNA gegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte entweder bei 16 °C über Nacht oder für 1 h bei 22 °C.

2.5.12 Gibson Assembly® bzw. NEBuilder®

Zur Klonierung wurde neben der herkömmlichen Methode über Fusions-PCR (siehe 2.5.3.2) und Ligation auch das *Gibson Assembly*®- (später dann *NEBuilder*®-) Kit von NEB verwendet. Diese Methode ermöglicht die Klonierung von mehreren DNA-Fragmenten in einer isothermalen Reaktion in weniger als einer Stunde. Dazu wurden zunächst mittels PCR homologe Enden an die etwa 1000 bp großen Bereiche aus der 5'- bzw. 3'-Region des zu deletierenden Gens angehängt. Mittels des *NEBuilder*®-Programms von NEB konnten die dazu benötigten Oligonukleotide konstruiert werden. Zusammen mit der linearisierten Vektor-DNA

wurden diese PCR-Fragmente dann mit dem *Gibson Assembly*[®] Enzym-Mix gemischt. Dieser Enzym-Mix enthält die T5-Exonuklease, eine Phusion DNA-Polymerase und die Taq-Ligase. Während der Inkubation bei 50 °C für 15 bis 30 min wurden die einzelnen Fragmente miteinander verbunden. Dabei baut die T5-Exonuklease die 5'-Enden der DNA-Stränge ab und produziert kohäsive Enden, die mit den jeweiligen Gegenstücken hybridisieren. Die Phusion-Polymerase nutzt dann die neugepaarten Abschnitte als Template und füllt die darin vorhandenen Lücken auf. Im letzten Schritt werden die Enden des integrierten Fragments und des Vektors über die Taq-Ligase miteinander verknüpft.

Bei der *Gibson*-Assemblierung passen die Bruchstücke lückenlos ineinander, ohne sog. Narben zu hinterlassen. Man spricht daher auch von einer nahtlosen Klonierungstechnik (*seamless cloning*).

2.5.13 Blau-Weiß-Test

Die erfolgreiche Ligation des Inserts mit der Vektor-DNA konnte in den meisten Fällen über den Blau-Weiß-Test überprüft werden. Hierzu wurden die Transformanden auf LB-Agar mit IPTG und X-Gal ausgestrichen. Klone, die ein Plasmid trugen, in das ein Insert kloniert wurde, blieben weiß. Klone, die Religanden des Vektors trugen, färbten sich auf dem Nährboden blau. Ob die Klonierung tatsächlich erfolgreich war, wurde über eine DNA-Sequenzierung bestätigt.

2.5.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Proben wurden hierfür nach den Anweisungen des Anbieters vorbereitet. Zur Sequenzierung der pk19mobsacB-Derivate wurden die Oligonukleotide M13 (s8228: *forward*-Primer bzw. s8229: *reverse*-Primer) verwendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Sequencher 5.0.

2.5.15 Markerfreie chromosomale Deletionen in *C. glutamicum*

Die Deletion einzelner Gene erfolgte über die Overlap Extension PCR oder über *Gibson Assembly*[®] bzw. *NEBuilder*[®]. Für die Overlap Extension wurden zunächst in zwei separaten

PCR-Reaktionen die beiden Sequenzabschnitte (ca. 1 kb) amplifiziert, die den zu deletierenden Abschnitt unmittelbar flankierten. Die verwendeten Oligonukleotide trugen an ihren 5'-Enden zusätzliche Nukleotide, die dem jeweiligen anderen Abschnitt entsprachen. Die PCR-Fragmente wiesen dadurch identische Sequenzabschnitte (ca. 20 b) zueinander auf. Darüberhinaus war es sinnvoll, die Nukleotide des Start- und des Stopcodons des zu deletierenden Gens zu erhalten und eine Restriktionsschnittstelle einzufügen. Die Oligonukleotide wurden unter Berücksichtigung dieser Anforderungen gewählt. Eine schematische Darstellung der Overlap Extension PCR ist in Abbildung 16 (Kapitel 3.1.1) zu sehen.

2.5.15.1 pk19mobsacB-System

Von *C. glutamicum* wurden Mutanten nach der von Schäfer (Schäfer *et al.* 1994) beschriebenen Methode konstruiert. Die erhaltenen Deletionsplasmide wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert. Durch Selektion auf Kanamycin-haltigen BHIS-Nährböden konnten Klone identifiziert werden, die durch homologe Rekombination das Plasmid in ihr Genom integriert hatten. Durch erneute Inkubation in Antibiotika-freiem Medium (BHIS) wurde ein erneutes Rekombinationsereignis ermöglicht. Das Plasmid ging nach erfolgtem Doppel-Cross-over durch den fehlenden Selektionsdruck wieder verloren, wodurch die Kanamycin-Resistenz nicht mehr vorhanden war. Im nächsten Selektionsschritt wurden die Transformanten auf BHI-Nährböden mit 10 % Saccharose (w/v) ausplattiert. Das *sacB*-Gen des Plasmids pk19mobsacB kodiert für das Enzym Levansucrase. Dieses Enzym spaltet Saccharose in die Monosaccharide Fruktose und Glukose und polymerisiert gleichzeitig Fruktose zu oligomerem Levan. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose lethal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.* 1992). Wurde das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt, fand ein Wachstum auf Saccharose statt. Dieses zweite Rekombinationsereignis führt entweder zur Wiederherstellung der ursprünglichen genetischen Situation (Wildtyp) oder zur Etablierung der gewünschten chromosomalen Mutation. Durch Kolonie-PCR wurden die Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klone analysiert.

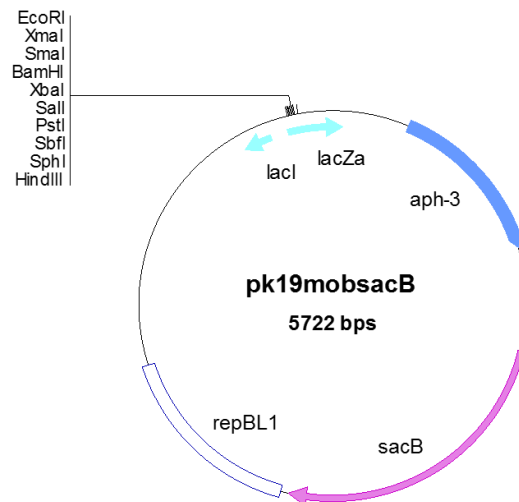


Abbildung 15: Plasmidkarte von pk19mobsacB

Zur markerfreien Deletion chromosomaler Gene wurde das Plasmid pk19mobsacB verwendet. Dieses trägt ein Kanamycinresistenzgen (*aph-3*) und das Gen für die Levansucrase (*sacB*) zur Selektion auf Saccharose.

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 Gen-Expression bei Vektoren mit Rhamnose- bzw. Arabinose-Promotor

Für die Expression von Genen wurden die *E. coli* Stämme JM109 und SoluBL21TM (Genlantis, USA) mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformiert. In dieser Arbeit wurden die Plasmide pJOE6089.4 (*Strep-Tag*[®], Rhamnose-Promotor) und pJOE6093.7 (MBP, Rhamnose-Promotor) verwendet. Zur Unterstützung der fehlerfreien Proteinfaltung und somit dem Erhalt einer löslichen Proteinfraktion wurde zusätzlich noch das Chaperon-codierende Helferplasmid pKJE7 (TaKaRa BIO INC., Japan, Arabinose-Promotor) in den Stamm eingebracht. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,3 wurde die Expression der Zielgene durch Zugabe von 0,2 % Rhamnose bzw. 0,05 % Arabinose induziert. Die Inkubation nach der Induktion erfolgte bei 30 °C. Nach 4 bis 6 h wurden die Zellen geerntet.

2.6.2 Zellaufschluss und Herstellung von Protein-Rohextrakten

Für die Herstellung von Protein-Rohextrakten wurden zunächst die *E. coli*-Zellen aus den 250 ml Induktionskulturen geerntet. Das nach der Zentrifugation (Kühlzentrifuge, Rotor GSA, 5.000

rpm, 10 min) erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml Puffer (für *Strep-Tag*[®]-Reinigung: 0,1 M TRIS/HCL (pH 8), für Reinigung über MBP: 0,1 M NaPP (pH 7)) resuspendiert. Der daran anschließende Zellaufschluss fand mittels Hochdruckhomogenisator statt und erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das erhaltene Zellhomogenat wurde abzentrifugiert (Kühlzentrifuge, Rotor SS-34, 20 min, 15.000 rpm) und der Überstand (Protein-Rohextrakt) für die folgende Aufreinigung verwendet.

2.6.3 Benzonase-Behandlung

Um mögliche DNA-Reste, die bei der späteren Aktivitätsbestimmung stören könnten, zu entfernen, wurde der Protein-Rohextrakt vor der weiteren Aufreinigung mit Benzonase behandelt. Dieses Enzym baut DNA ab. Dazu wurde 1 µl des Enzyms (250 U/µl) zum gesamten Rohextrakt gegeben und der Ansatz für 30 min bei 30 °C inkubiert.

2.6.4 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Zur *Strep-Tag*[®] (Skerra und Schmidt 1999) Aufreinigung wurde eine 5 ml Säule mit 1 ml *Strep-Tactin*[®] Sepharose (5 mg/ml) gefüllt. Bevor der Rohextrakt auf die Säule gegeben werden konnte, wurde die Matrix zunächst mit Puffer W equilibriert. Der Protein-Rohextrakt wurde in 2 Schritten (je 5ml) auf die Säule pipettiert und der Durchlauf in einem 15 ml-Schraubdeckel-Röhrchen aufgefangen. Danach wurde die Säule fünfmal mit 1 ml Puffer W gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in sechs Schritten mit jeweils 500 µl Puffer E. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Zur Regeneration wurden 10 ml Puffer R auf die Säule gegeben und diese bis zur nächsten Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine, die das Maltose-Bindeprotein trugen, erfolgte über Amylose Resin von NEB (New England Biolabs). Hierfür wurde eine Säule mit ca. 2 ml der gelösten Affinitätsmatrix gepackt. Nachdem das Säulenmaterial dreimal mit 10 ml Waschpuffer equilibriert worden war, konnte der Rohextrakt auf die Säule gegeben werden. Der Durchlauf wurde in einem 15 ml-Schraubdeckelröhrchen aufgefangen. Im Anschluss daran wurde das nichtgebundene Material mittels des Waschpuffers aus der Matrix entfernt. Dazu wurden 8 x 1 ml des Puffers auf die Säule pipettiert. Die einzelnen Waschfraktionen wurden

in einem 15 ml-Schraubdeckelröhrchen gesammelt. Die Elution des gesuchten Fusionsproteins erfolgte über die Zugabe von 6x 500 µl des Elutionspuffers. Die Fraktionen aus den verschiedenen Elutionsschritten wurden einzeln in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Die Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen verfolgt.

2.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Für den quantitativen Nachweis von Proteinen wurde die Bradford-Methode (Bradford 1976) angewandt. Hierbei wird Coomassie-Brillant-Blau G-250 verwendet, dessen Absorptionsmaximum bei 470 nm liegt. Nach Bindung des im ungebundenen Zustand roten Farbstoffes an Proteine liegt dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm (Compton und Jones 1985).

Zur Proteinbestimmung wurden 797 µl H₂O mit 3 µl Rohextrakt gemischt. Als Leerwert dienten 800 µl H₂O. Zu dem verdünnten Rohextrakt wurden 200 µl BioRad Protein Assay Dye Reagent zugegeben und die Ansätze gut gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD bei 595 nm bestimmt. Definierte BSA-Lösungen dienten zuvor der Erstellung einer Eichgeraden, mithilfe deren Geradengleichung die Proteinkonzentration ermittelt werden konnte.

2.6.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen, dem Nachweis exprimierter Gene und der Kontrolle von Proteinaufreinigungen. Das SDS (Sodiumdodecylsulfat) lagert sich an die hydrophoben Reste der Proteine an und maskiert so deren negative Ladung. Weiterhin befindet sich DTT im Probenpuffer, welches Disulfidbrücken spaltet. Die somit stark negativ geladenen Proteine können nun elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierbei werden Polyacrylamid-Gele verwendet, die durch radikalische Polymerisation des Monomers Acrylamid und des quervernetzenden Methylenbisacrylamid entstehen. Die Auftrennung der Proteine wird durch die entstehende Porengröße beeinflusst und ist abhängig von den

eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentrationen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich 10 %ige (v/v) Gele verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden zunächst die Glasplatten mit 99,8 % (v/v) Ethanol gereinigt. Es wurde das Gel-Kammer-System der Firma BioRad verwendet. Die Glasplatten wurden zum Gießen in die Apparatur eingespannt und die Dichtigkeit zunächst mit Ethanol geprüft. Nach dem Befüllen der Kammer zu etwa 3/4 mit dem Trenngel, wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol durch Abkippen wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Dieser wurde nach der Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Pufferkammern der Elektrophorese-Apparatur mit SDS-Laufpuffer bis zur Markierung befüllt. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel kann 2.2.7 entnommen werden. Um mögliche Gelreste oder auch nicht polymerisiertes Acrylamid aus den Probenaschen zu entfernen, wurden diese vor dem Probenauftrag mit SDS-Laufpuffer durchgespült.

Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden diese mit 5x SDS Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C erhitzt. Je nach Proteinkonzentration wurden zwischen 2 und 10 µl der Proben aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteine dienten 5 µl des Proteinstandards „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Scientific). Bei 20 V/cm wurden die Proben zunächst im Sammelgel bei neutralem pH aufkonzentriert und im Übergang zum Trenngel bei basischem pH anhand ihrer Größe aufgetrennt. Sobald die Bromphenol-Front aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet. Durch anschließende Coomassie-Färbung konnten die Proteinbanden detektiert werden. Nach Inkubation bei RT für etwa 1 h in der Färbelösung wurden die Gele durch mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung entfärbt. Auch dieser Schritt erfolgte bei RT. Nachdem der ungebundene Farbstoff aus den Gelen entfernt war, wurden die Proteinbanden mittels 7 % (v/v) Essigsäure fixiert.

2.7 Enzymtests

2.7.1 Nachweis der Exonukleaseaktivität über Degradierung von DNA

Mittels Agarosegel

Um die Nukleaseaktivität von RecJ und RecB nachzuweisen, sollte der Abbau der DNA auf dem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden zunächst 3 verschiedene DNA-Fragmente mit verschiedenen Enden konstruiert. Es wurden verschiedene Oligonukleotide (siehe Tabelle 10) erstellt, die dann durch Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen auf RT hybridisierten. Diese wurden so gewählt, dass ein Doppelstrang mit glatten Enden, einer mit einem 10 Basen (b)-Überhang an beiden 3'-Enden und ein Doppelstrang mit 10 b 5'-Überhang an beiden Enden entstanden sind. Die Länge der einzelnen Oligonukleotide betrug 70 b. Diese DNA-Fragmente dienen im Anschluss als Substrate für die aufgereinigten Proteine. Pro Enzym wurden 3 Ansätze hergestellt. Zu dem jeweiligen DNA-Fragment (etwa 30 ng, ohne Überhang, 3'-Überhang bzw. 5'-Überhang) wurden ca. 2,5 µg der Proteine pipettiert. Die Ansätze wurden dann noch mit 1x NEBuffer™ 2 bei RecJ (50 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9) bzw. 1x T4-Ligationspuffer bei RecB (660 mM TRIS-HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5) von Thermo Fischer Scientific auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die gesamten Ansätze auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und der Abbau der DNA unter UV-Licht detektiert.

Mittels Polyacrylamidgel

Zur Untersuchung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB wurde neben der elektrophoretischen Auftrennung über ein Agarosegel auch die PAGE angewandt. Hierzu wurden die jeweiligen Ansätze (sowohl mit unmarkierter DNA als auch mit Fluoreszenz-markierten DNA-Substraten) auf ein 15 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 2 V/cm aufgetrennt. Wurde unmarkierte DNA eingesetzt, so wurde das PAA-Gel nach der Elektrophorese mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) nachgefärbt. Die Detektion erfolgte anschließend unter UV-Licht. Der Einsatz Fluoreszenz-markierter DNA ermöglichte die Detektion mittels Phosphoimagers ohne vorheriges Einfärben. Hier fand der Gellauf allerdings in einem abgedunkelten System statt.

2.7.2 Nachweis der Helikase-Aktivität

Zum Nachweis der Helikase-Aktivität von RecB wurde eine Methode herangezogen, die 2015 von Dewhare beschrieben wurde (Dewhare *et al.* 2015). Dazu wurden zunächst Y-förmige Duplex-DNA-Fragmente hergestellt. Das Oligonukleotid S11178*5 wurde mit S11177 bzw. S11215 hybridisiert. Diese einzelnen DNA-Fragmente hatten eine Länge von 62 bis 80 b. Eines der beiden Oligonukleotide (S11178*5) wurde zuvor am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markiert (MWG Eurofins, Ebersberg). Durch komplementäre Abschnitte von 22 Basen am 5'-Ende des einen und am 3'-Ende des anderen Fragments, konnten die beiden Oligonukleotide miteinander hybridisieren, wodurch eine Y-förmige Struktur entstand. Die Hybridisierung erfolgte durch Aufkochen der zusammengehörigen Fragmente. Nach der Zugabe von 40 µl des Hybridisierungspuffers zu je 20 µl der zu fusionierenden Oligonukleotide (2 µg/µl) wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben langsam (über etwa 2 h) auf Raumtemperatur abgekühlt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden dann noch mit 80 µl H₂O auf eine Endkonzentration von ca. 300 ng/µl verdünnt. Für den Assay wurden 400 ng der Duplex-DNA mit etwa 2,5 µg des gereinigten Fusionsproteins MBP-RecB gemischt. Außerdem wurde dieser Ansatz zusätzlich mit 1x T4-Ligationspuffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Nach einer Inkubation für 3 h bei 30 °C wurden die Ansätze mit Auftragspuffer gemischt und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 2 V/cm für 1 h durchgeführt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von FITC wurde der Versuch im Dunkeln durchgeführt. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurde diese mittels Phosphoimager detektiert. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes fand bei 495 nm statt. Das Emissionsspektrum lag bei 519 nm.

2.8 Mutagenese von *C. glutamicum*

2.8.1 UV-Mutagenese

Aus einer ÜNK (5 ml, LB₀) wurden zunächst 10 ml LB₀ (100 ml Schüttelkolben mit Schikane) mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Nach Inkubation auf dem Schüttler (200 upm) bei 30 °C und Erreichen von einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde eine geeignete Verdünnung von *C. glutamicum* mit LB₀ hergestellt. Im nächsten Schritt wurden ca. 500 bis 1000 Zellen auf LB₀-Nährböden ausplattiert. Zur Bestrahlung mit UV-Licht wurden die einzelnen Platten dann

ohne Deckel mittig in dem UV-Stratalinker platziert und mit verschiedenen Strahlungsintensitäten behandelt. Die Strahlungsintensitäten variierten dabei von 0 bis 10 bzw 0 bis 100 J/m². Dabei war darauf zu achten, dass die bestrahlten Agarplatten direkt nach der Prozedur im Dunkeln gehalten wurden um eine direkte Reparatur durch die Photolyase zu vermeiden. Nach 48 h bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien mittels flash and go-Kolonienzähler (IUL Instruments) gezählt und die Überlebensraten der UV-Licht-bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bestimmt.

2.8.2 Zeocin-Mutagenese

Für diesen Versuch wurden LB-Agarplatten mit verschiedenen Zeocin-Konzentrationen hergestellt. Dazu wurde direkt vor dem Gießen der etwa 55 °C warme LB-Agar mit verschiedenen Volumina aus einer Zeocin-Stammlösung versetzt. Es war darauf zu achten, dass die Flaschen mit dem Medium nach der Zugabe von Zeocin aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit lichtgeschützt gehalten wurden. Außerdem mussten die Nährlösungen mindestens 5 min mit dem Magnetrührer gründlich gemischt werden um eine gleichmäßige Verteilung des Mutagens zu gewährleisten. Nach diesem Prinzip wurden dann Agarplatten mit einer Endkonzentration von 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 und 2,0 µg/ml Zeocin hergestellt. Die LB_{Zeocin}-Platten wurden im Dunkeln bei 6 °C für maximal 3 Wochen gelagert.

Die Anzucht der Stämme erfolgte wie bei der UV-Mutagenese (siehe 2.7.3). Nach dem Ausplattieren auf den Zeocin-Platten wurden diese ebenfalls im Dunkeln für 2 Tage bei 30 °C inkubiert und durch Auszählen der Kolonien die Überlebensraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bestimmt.

2.8.3 Mitomycin C-Mutagenese

Für diesen Mutagenese-Versuch wurde eine Mitomycin C (MMC)-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. 140 µl-Aliquots dieser Lösung wurden bei -70 °C gelagert und für die Mutagenese immer frisch aufgetaut. Aufgrund seiner Mutagenität wurde beim Arbeiten mit MMC darauf geachtet, Handschuhe zu tragen.

Die Anzucht der Zellen erfolgte wieder wie bei 2.7.1 (UV-Mutagenese). Die Kulturen wurden zunächst so mit LB₀ verdünnt, dass etwa 20.000 Zellen pro ml enthalten waren.

Aus der aufgetauten MMC-Stammlösung wurden anschließend mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verschiedene Verdünnungen hergestellt. Die Endkonzentrationen betragen 25, 50, 75 und 100 µg/ml. Zu je 200 µl dieser MMC-Lösungen wurden 100 µl der Zellsuspensionen pipettiert. Als Kontrolle dienten 200 µl 0,9 % NaCl. Sofort nach der Zugabe der Zellen wurden die Ansätze durch vortexen gemischt und auf LB₀ ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C wurden auch hier durch Auszählen der Kolonien die Überlebensraten der einzelnen Stämme nach Behandlung mit MMC ermittelt.

2.8.4 MNNG-Mutagenese

Mit MNNG wurde ebenfalls sehr vorsichtig und immer mit Handschuhen gearbeitet.

Nach Herstellung einer Stammlösung (20 mg/ml MNNG in DMSO) wurde diese bei -20 °C gelagert und das benötigte Aliquot unmittelbar vor dem Versuch aufgetaut.

Für die MNNG-Mutagenese wurden 40 ml LB₀ (500 ml Schüttelkolben mit Schikane) aus einer 5 ml ÜNK angeimpft. Die Start-OD₆₀₀ sollte wieder 0,1 betragen. Nach etwa 2,5 h bei 30 °C (200 rpm) lag die OD₆₀₀ bei ca. 0,4. Die Hauptkultur wurde dann in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen überführt und die Zellen sedimentiert (Heraeus Megafuge, 10 min, 4.500 rpm, RT). Das erhaltene Pellet wurde in 7 ml 0,2 M NaAc pH 5,5 aufgenommen und je 1 ml auf 6 Glasröhrchen verteilt. Zu diesen Zellsuspensionen wurden dann verschiedene Volumina der MNNG-Lösung pipettiert. Die Endkonzentrationen in den verschiedenen Ansätzen betragen dabei 0, 0,4, 0,8, 1,2 und 1,6 µg/ml. Die Reaktionsansätze wurden im nächsten Schritt für eine Stunde bei 30 °C auf dem Roller inkubiert und anschließend zentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT). Die erhaltenen Pellets wurden in 2 ml LB₀ resuspendiert und die OD₆₀₀ des Kontroll-Ansatzes (ohne MNNG) bestimmt. Auf Grundlage dieser Zelldichte-Bestimmung wurden Verdünnungen (mit LB₀) der einzelnen Ansätze hergestellt, so dass etwa 500 Zellen pro LB₀-Agarplatte ausplattiert wurden. Nach 48h bei 30 °C konnte die Auswertung am Kolonienzähler (*flash and go*, IUL Instrumets) und die Ermittlung der Überlebensraten stattfinden.

3 Ergebnisse

Zunächst werden im Ergebnis-Teil die einzelnen Deletionsmutanten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und deren Herstellung genauer beschrieben. Im Weiteren liegt der Focus auf der Etablierung geeigneter Mutagenese-Methoden und der Charakterisierung der verschiedenen *Knock-Out*-Mutanten.

3.1 Herstellung verschiedener Deletionsstämme von *C. glutamicum* ATCC 13032

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu inaktivieren, die in *C. glutamicum* an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind. Eine zuverlässige aber aufwendige Methode für die Geninaktivierung ist die Deletion des gesamten Gens. Für die Konstruktion der Plasmide mit entsprechenden Deletionskassetten wurden die Klonierungsarbeiten in *E. coli* durchgeführt.

3.1.1 Deletion chromosomaler Gene

Um ein spezifisches Gen aus dem Chromosom zu entfernen, wurden zunächst die flankierenden Bereiche, also die 5'- und 3'-Region des Gens, mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass Fragmente mit einer Größe von etwa 1000 bp entstanden. In der folgenden Abbildung (Abbildung 16) ist die Lage der verwendeten Primer auf dem Chromosom dargestellt.

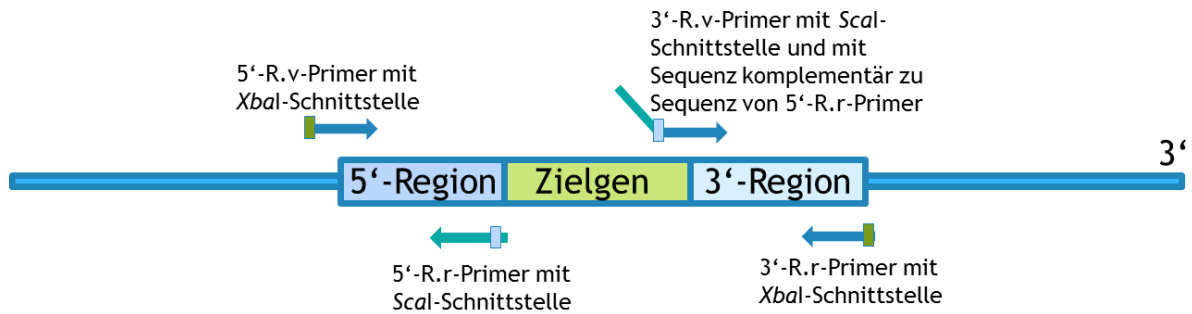


Abbildung 16: Design der Primer zur Amplifikation der 5'- und 3'-Region des Zielgens

Schematisch gezeigt werden das Zielgen sowie dessen flankierende Bereiche auf dem Chromosom. Zur Amplifizierung dieser Abschnitte wurden die Primer wie in der Abbildung beispielhaft dargestellt, designt. 5'-R.v.: Vorwärts-Primer zur Amplifizierung der 5'-Region, 5'-R.r.: Rückwärts-Primer des 5'-flankierenden Bereichs, 3'-R.v.: Vorwärts-Primer der 3'-Region, 3'-R.r.: Rückwärts-Primer der 3'-Region. Die kleinen Rechtecke auf den Pfeilen stellen die jeweiligen Restriktionsschnittstellen dar (*Scal* = hellblau, *XbaI* = dunkelgrün). Der homologe Sequenzbereich des 5'-R.r-Primers und des 3'-R.v-Primers wird durch die gleiche Farbe (türkis) gekennzeichnet.

Die Graphik zeigt beispielhaft die Verhältnisse auf dem Chromosom. Dargestellt sind das Zielgen und die flankierenden Bereiche. Nach Amplifikation der 5'- und 3'-flankierenden Regionen konnten diese aufgrund der überlappenden Sequenzen in den Primern durch PCR miteinander fusioniert werden. Die Klonierung des dabei erhaltenen DNA-Fragments erfolgte dann über *XbaI*. Die *Scal*-Schnittstelle diente zur Absicherung. Falls die Fusions-PCR nicht gelang, war eine 3-Fragmente-Ligation über *XbaI* und *Scal* möglich. Das Design der verwendeten Primer wurde für jedes Gen individuell gewählt und die Wahl der Restriktionsschnittstellen erfolgte in Abhängigkeit der zu amplifizierenden Sequenzen. Im Folgenden sind die allgemeinen Eigenschaften der einzelnen Primer aufgeführt.

5'-R.v-Primer (5'-Region vorwärts-Primer)

5'-AAAAAA(Schnittstelle)nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn-3'

Dieser Primer dient zur Amplifizierung der 5'-Region des zu deletierenden Gens. Zur Klonierung trägt dieses Oligonukleotid eine Restriktionsschnittstelle (bezogen auf Abbildung 16: *Xba*I) an seinem 5'-Ende. Um den Restriktionsverdau zu erleichtern, werden vor diese Schnittstelle noch weitere 6 Nukleotide (AAAAAA) gesetzt. An die Schnittstelle anschließend folgen ca. 20 sequenzspezifische Nukleotide. Diese binden etwa 1000 Basen aufwärts des Zielgens.

5'-R.r-Primer (5'-Region rückwärts-Primer)

5'-AAAAAA(Schnittstelle)CATnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn-3'

Auch dieser Primer wird benötigt um die 5'-Region des Zielgens zu amplifizieren. Im Beispiel aus Abbildung 16 folgt hier nach AAAAAA eine *Kpn*I-Schnittstelle. Der sequenzspezifische Bereich beginnt bei diesem Primer mit dem revers komplementären Startcodon (Hier: ATG - CAT). Dadurch bleibt das Startcodon des deletierten Gens erhalten. Auch die folgenden Nukleotide sind revers komplementär zur Sequenz stromaufwärts des Zielgens.

3'-R.v-Primer (3'-Region vorwärts-Primer)

5'-nnnnnnnnnnnnnnnnnnATG(Schnittstelle)TAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn-3'

Zur Amplifizierung des flankierenden Bereiches 3' zum Zielgen (3'-Region) wird dieses Oligonukleotid benötigt. Die ersten ca. 20 Nukleotide sind revers komplementär zu den 20 Nukleotiden des 3'-Endes des 5'-R.r-Primers inklusive des Startcodons ATG. Somit enthält das amplifizierte Fragment am 5'-Ende eine Sequenzhomologie zum 3'-Ende des anderen Fragments. Die letzten 20 Nukleotide sind sequenzspezifisch zum stromabwärts des Zielgens liegenden Bereich, beginnend mit dem Stopcodon des zu deletierenden Gens (hier: TAG). Getrennt werden diese beiden Sequenzen wiederum durch eine *Kpn*I-Schnittstelle.

3'-R.r-Primer (3'-Region rückwärts-Primer)

5'-AAAAAA(Schnittstelle)nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn-3'

Die Amplifizierung der 3'-Region (stromabwärts des Zielgens) erfordert diesen weiteren Primer. Anschließend an die 6 Nukleotide folgt wieder eine Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Deletionsvektor (hier: *Xba*I). Die ca. 20 Nukleotide sind wiederum revers komplementär zu einem etwa 1000 Basen stromabwärts des Zielgens liegenden Bereich.

Mit den beiden Primerpaaren wurden dann die 5'- und die 3'-Region in zwei getrennten PCRs amplifiziert. Nach der PCR wurden die etwa 1000 bp großen Fragmente aufgereinigt und gemeinsam als Template in eine weitere PCR eingesetzt. Bei dieser Fusions-PCR wurden dann die beiden Fragmente durch die Sequenzhomologie am 3'-Ende der 5'-Region und am 5'-Ende der 3'-Region miteinander fusioniert. Hierbei dienten die beiden „äußeren“ Primer (5'-R.v-Primer und 3'-R.r-Primer) als Startpunkte für die Polymerase.

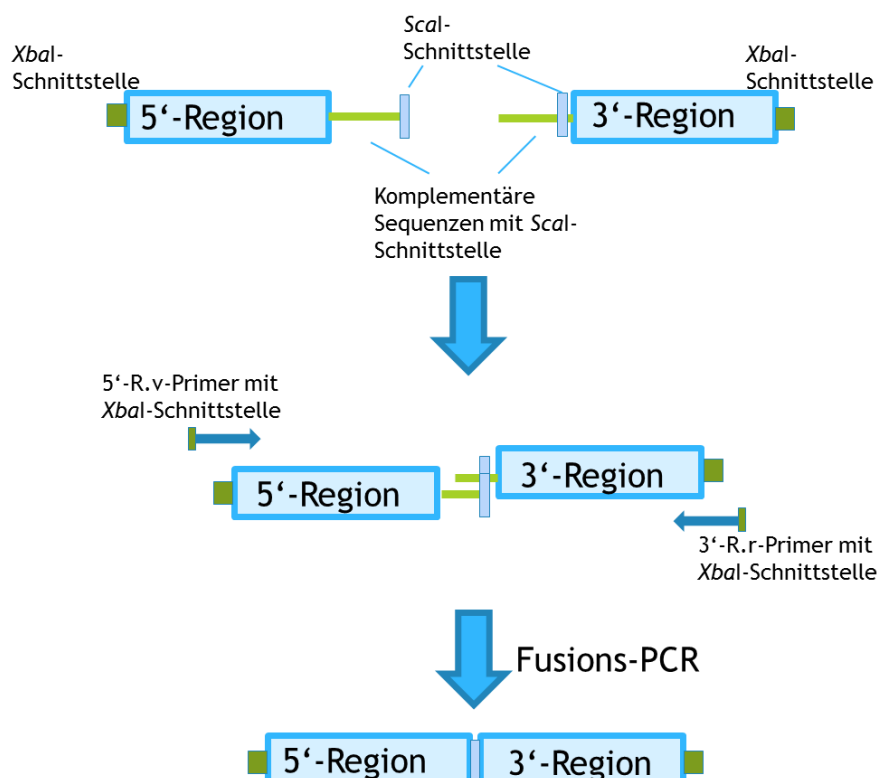


Abbildung 17: Fusion der beiden flankierenden Bereiche mittels PCR

Durch die Sequenzhomologie der beiden amplifizierten Fragmente kann mittels einer weiteren PCR eine Fusion der 5'-Region und der 3'-Region erfolgen.

Nach erfolgreicher Fusion wurde dieses PCR-Produkt ebenfalls aufgereinigt und entsprechend der gewählten Schnittstelle (hier: *Xba*I) verdaut. Anschließend wurde dieses Fragment mit dem Vektor pk19mobsacB ligiert, welcher auch mittels *Xba*I linearisiert und mit Alkalischer Phosphatase behandelt worden war. In der folgenden Abbildung werden beispielhaft für pFD14 (*recA*-Deletionsplasmid) die einzelnen Schritte der Klonierung dargestellt.

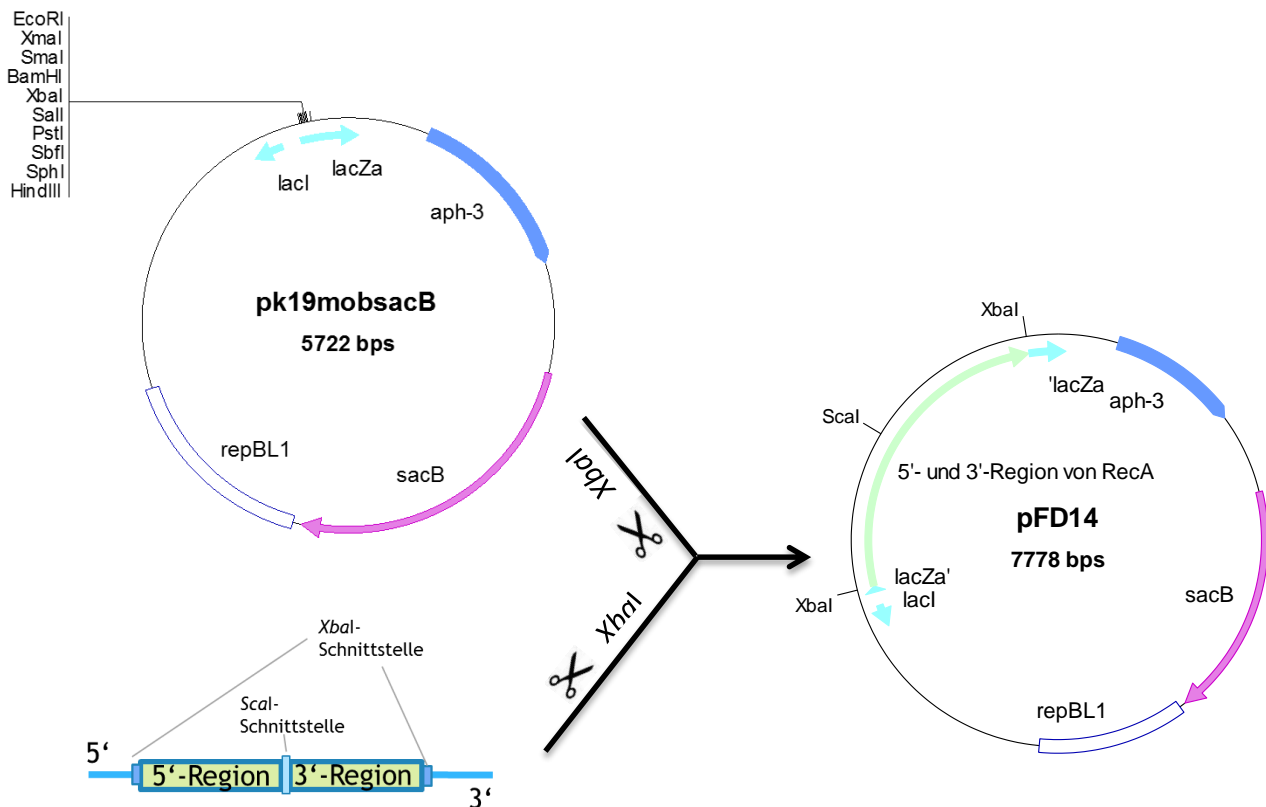


Abbildung 18: Konstruktionsschema eines Deletionsplasmids am Beispiel von *recA*

Nach der Ligation von pk19mobsacB und dem PCR-Fragment mit der fusionierten 5'- und 3'-Region von *recA* entsteht das Deletionsplasmid (hier: pFD14). *aph-3*: Kanamycin-Resistenzgen, *repBL1*: Replikationsursprung in *E. coli*, *sacB*: Gen für die Levansucrase, *lacZα*: Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase, *recA*: Fusionsprodukt von der 5'- und der 3'-Region von *recA*.

Der Vektor pk19mobsacB wurde bereits im Material und Methoden-Teil genauer beschrieben (siehe 2.5.15.1). Die Deletion der Gene erfolgte durch zweifache homologe Rekombination, wodurch das Zielgen vollständig aus dem Chromosom entfernt wurde. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Deletionsstämme und ihre Konstruktion genauer vorgestellt.

Im Fall der Herstellung des Plasmids für die Deletion von *uvrA* und *uvrD* wurden die Produkte der Fusions-PCR zunächst in den Vektor pUC18 (*uvrA*) bzw. pJOE4786.1 (*uvrD*) eingefügt und anschließend mit einem anderen geeigneten Restriktionsenzym wieder herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde dann, wie bereits beschrieben, in den Zielvektor pk19mobsacB ligiert.

Eine weitere Methode zur Herstellung der Deletionsplasmide ist die Konstruktion über *Gibson Assembly*[®]. Dieses Verfahren wurde in Kapitel 2.5.12 genau beschrieben.

Welche Methode bei der Konstruktion der einzelnen Plasmide angewandt wurde, wird in folgender Auflistung aufgeführt.

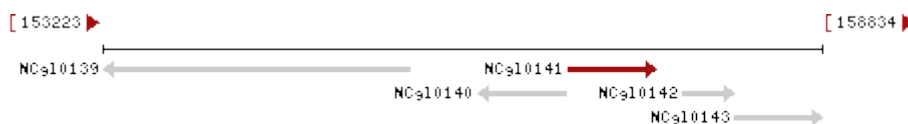
3.1.2 Konstruierte Deletionsstämme

Die zu deletierenden Gene wurden so gewählt, dass aus jedem Reparaturweg verschiedene Gene entfernt werden. Die Darstellungen der Genumgebung wurden von GenoList (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList>) übernommen.

Aus dem Mechanismus der Direkten Reparatur wurden die Gene *alkB* und *ogt* deletiert.

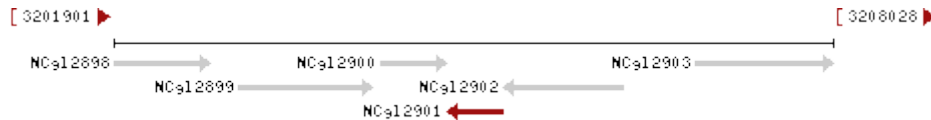
Deletion von *alkB* (NCgl0141/Cgl0144)

Position im Genom:	156848 - 157540
Protein:	Oxidative Demethylase, 230 AS
Funktion:	entfernt Methylgruppen aus Basen während DR
verwendete Primer:	S8456, S8457, S8458, S8459
Methode:	Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids:	pFD7
Name des Deletionsstammes:	FD4



Deletion von *ogt* (NCgl2901/Cgl3003)

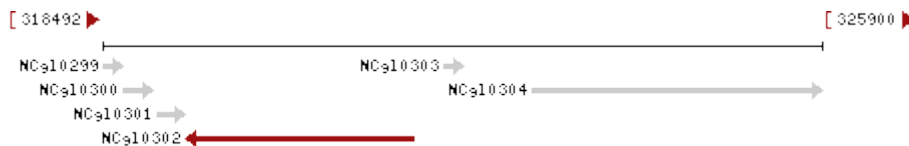
Position im Genom: 3204729 - 3205205
Protein: Methyltransferase, 159 AS
Funktion: entfernt Methylgruppen von Basen während DR
verwendete Primer: S9235, S9236, S9237, S9238
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD20
Name des Deletionsstammes: FD15



Zur Untersuchung der Basenexzisionsreparatur wurden folgende Gene deletiert.

Deletion von *alkA* (Cgl0145)

Position im Genom: 319341 - 321689
Protein: 3-Methyladenin-Glykosylase, 785 AS
Funktion: entfernt alkylierte Basen aus DNA während BER
verwendete Primer: S8512, S8513, S8514, S8515
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD9
Name des Deletionsstammes: FD2



Deletion von *mutM* (NCgl1993/Cgl2073)

Position im Genom: 2188310 - 2189143
Protein: Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, 278 AS
Funktion: entfernt alkylierte Basen aus DNA während BER
verwendete Primer: S8619, S8620, S8621, S8622
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD12
Name des Deletionsstammes: FD5



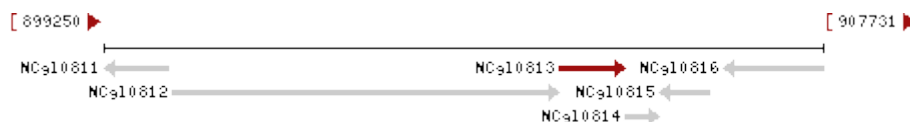
Deletion von *ung* (NCgl1270/Cgl1324)

Position im Genom: 1388312 - 1389076
Protein: Uracil-DNA-Glykosylase, 255 AS
Funktion: entfernt Uracil aus der DNA in der BER
verwendete Primer: S8508, S8509, S8510, S8511
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD10
Name des Deletionsstammes: FD6



Deletion von *nei* (NCgl0813/Cgl0847)

Position im Genom: 904615 - 905385
Protein: Endonuklease VIII, 251 AS
Funktion: entfernt AP-Stelle in BER
verwendete Primer: S8703, S8704, S8705, S8706
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD13
Name des Deletionsstammes: FD8



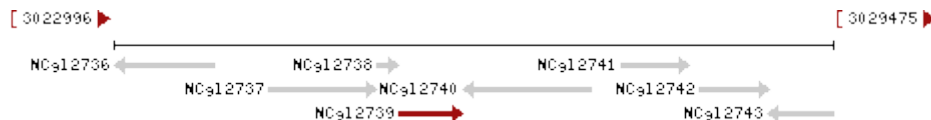
Deletion von *nth* (NCgl0288/Cgl0293)

Position im Genom: 307955 - 308737
Protein: Endonuklease III, 261 AS
Funktion: entfernt AP-Stelle in BER
verwendete Primer: S8933, S8934, S8935.1, S8936
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD15
Name des Deletionsstammes: FD9



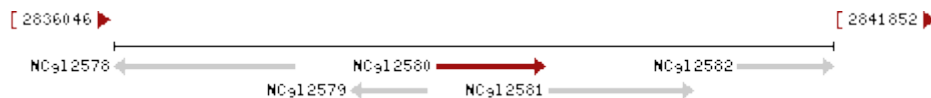
Deletion von *tagI* (NCgl2739/Cgl2837)

Position im Genom: 3025553 - 3026143
Protein: 3-Methyladenin-DNA-Glykosylase, 196 AS
Funktion: entfernt alkylierte Base während BER
verwendete Primer: S8961, S8938, S8939, S8962
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD16
Name des Deletionsstammes: FD10



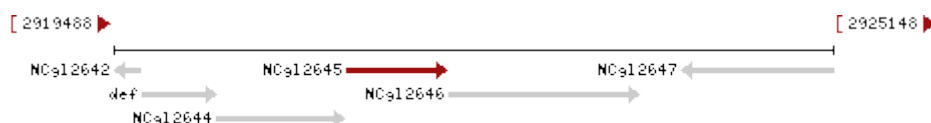
Deletion von *mutY* (NCgl2580/Cgl2671)

Position im Genom: 2838644 - 2839525
Protein: Adenin-DNA-Glykosylase, 293 AS
Funktion: entfernt alkylierte Adenin- oder Guaninbase während der BER
verwendete Primer: S8805, S8624, S8625, S8806
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD18
Name des Deletionsstammes: FD12



Deletion von *xth* (NCgl2645/Cgl2741)

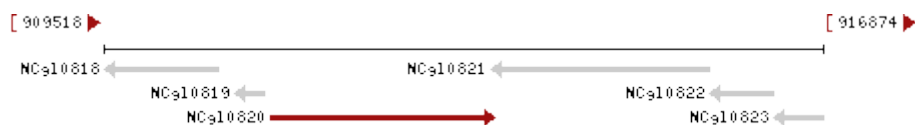
Position im Genom: 2921321 - 2922112
Protein: Exonuklease III, 263 AS
Funktion: entfernt 3'-Phosphat während BER
verwendete Primer: S9606, S9607, S9608, S9609
Methode: Gibson Assembly®
Name des Knock-out-Plasmids: pFD28
Name des Deletionsstammes: FD19



Aus der Nukleotidexzisionsreparatur wurden die Gene *uvrD* und *uvrA* deletiert.

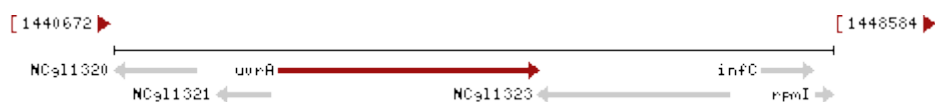
Deletion von *uvrD* (NCgl0820/Cgl0854)

Position im Genom: 911226 - 913517
Protein: ATP-abhängige DNA-Helikase, 763 AS
Funktion: entfernt geschädigtes DNA-Stück während NER
verwendete Primer: S8347, S8348, S8359, S8350
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD4
Name des Deletionsstammes: FD1



Deletion von *uvrA* (NCgl1322/Cgl560)

Position im Genom: 1442487 - 1445336
Protein: ATPase und DNA-Bindeprotein, 949 AS
Funktion: bindet an DNA-Schäden (*bulky adducts*) und initiiert NER
verwendete Primer: S8433, S8344, S8345, S8434
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD6
Name des Deletionsstammes: FD3



Zur Untersuchung der Rekombinationsreparatur war die Deletion folgender Gene interessant.

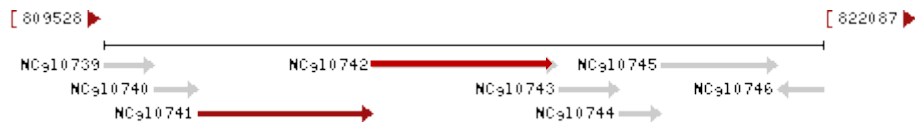
Deletion von *recA* (NCgl1880/Cgl1955)

Position im Genom: 2063986 - 2065116
Protein: Rekombinase, 376 AS
Funktion: sucht nach homologen Bereichen bei HR
verwendete Primer: S8699, S8700, S8701, S8702
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD14
Name des Deletionsstammes: FD7



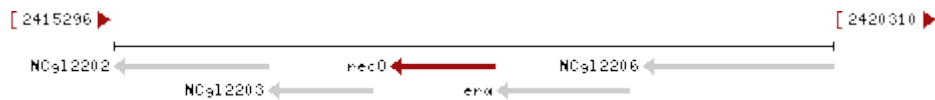
Deletion von *adnAB* (*adnA*: NCgl0741/Cgl0775; *adnB*: NCgl0742/Cgl0776)

Position im Genom: 811170 - 817425
Protein: Helikase/Nuklease, 2085 AS
Funktion: generiert 3'-Überhang bei HR
verwendete Primer: S9577, S9578, S9579, S9580
Methode: Gibson Assembly®
Name des Knock-out-Plasmids: pFD23
Name des Deletionsstammes: FD16



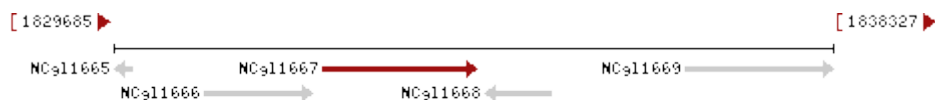
Deletion von *recO* (NCgl2204/Cgl2284)

Position im Genom: 2417220 - 2417948
Protein: DNA-Reparaturprotein, 242 AS
Funktion: vermittelt RecA-Bindung bei HR
verwendete Primer: S9420, S9421, S9422, S9423
Methode: Fusions-PCR
Name des Knock-out-Plasmids: pFD22
Name des Deletionsstammes: FD17



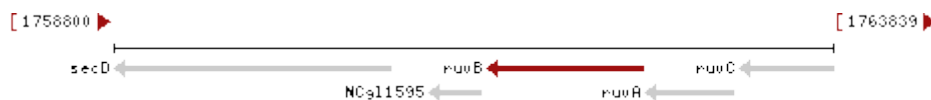
Deletion von *recJ* (NCgl1667/Cgl1737)

Position im Genom: 1832140 - 1834047
Protein: ssDNA Exonuklease, 620 AS
Funktion: Einzelstrang-Abbau in 5'-3'-Richtung während HR
verwendete Primer: S9615, S9616, S9617, S9618
Methode: Gibson Assembly®
Name des Knock-out-Plasmids: pFD27
Name des Deletionsstammes: FD20



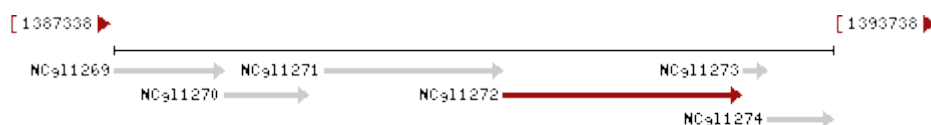
Deletion von *ruvB* (NCg11596/Cgl1660)

Position im Genom: 1761416 - 1762498
Protein: *Holliday Junction*-Helikase, 360 AS
Funktion: Migration der Überkreuzungsstrukturen in postsynaptischer Phase der HR
verwendete Primer: S9907, S9908, S9909, S9910
Methode: *Gibson Assembly*[®]
Name des Knock-out-Plasmids: pFD25
Name des Deletionsstammes: FD21



Deletion von *recG* (NCg11272/Cgl1326)

Position im Genom: 1390796 - 1392919
Protein: 3'-5'-Helikase, 707 AS
Funktion: Migration der Überkreuzungsstrukturen in postsynaptischer Phase der HR
verwendete Primer: S10025, S10026, S10027, S10028
Methode: *Gibson Assembly*[®]
Name des Knock-out-Plasmids: pFD29
Name des Deletionsstammes: FD22



Deletion von *recB* (NCg11443/Cgl1500)

Position im Genom: 1580807 - 1581643
Protein: Exonuklease V/ Helikase, 278 AS
Funktion: vermittelt RecA-Bindung bei HR
verwendete Primer: S10562, S10563, S10564, S10565
Methode: *Gibson Assembly*[®]
Name des Knock-out-Plasmids: pFD44
Name des Deletionsstammes: FD46



Tabelle 13: Übersicht der erhaltenen Deletionsstämme

Reparaturweg	Name des Deletionsstammes	deletiertes Gen
Direkte Reparatur	FD4	<i>alkB</i>
	FD15	<i>ogt</i>
Basenexzisions-reparatur	FD2	<i>alkA</i>
	FD5	<i>mutM</i>
	FD6	<i>ung</i>
	FD8	<i>nei</i>
	FD9	<i>nth</i>
	FD10	<i>tagl</i>
	FD12	<i>mutY</i>
	FD19	<i>xth</i>
Nukleotidexzisions-reparatur	FD1	<i>uvrD</i>
	FD3	<i>uvrA</i>
Rekombinations-reparatur	FD7	<i>recA</i>
	FD16	<i>adnAB</i>
	FD17	<i>recO</i>
	FD20	<i>recJ</i>
	FD21	<i>ruvB</i>
	FD22	<i>recG</i>
	FD46	<i>recB</i>

Zusätzlich zu den Einzelmutanten wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten hergestellt. Hierzu wurden die entsprechenden Einzelmutanten nacheinander mit den weiteren jeweiligen Deletionsvektoren transformiert. Dabei entstanden folgende Mutanten.

Tabelle 14: Übersicht der Mehrfach-Mutanten

Name des Deletionsstammes	deletierte Gene	Ausgangsstamm	Reparaturweg
FD11	<i>tagl, alkA</i>	FD10	BER
FD13	<i>tagl, alkA, mutY</i>	FD11	BER
FD14	<i>nth, nei</i>	FD9	BER
FD47	<i>recB, adnAB</i>	FD46	HR

Die Herstellung weiterer Mehrfachmutanten von Genen aus dem Bereich der Homologen Rekombination erwies sich als nicht möglich, da die benötigten Ausgangsstämme durch den

Defekt in der homologen Rekombination die Vektoren offensichtlich nicht mehr in das Chromosom integrieren konnten und somit auch keine Transformanten erhalten wurden.

Nach der Transformation von *C. glutamicum* durch Elektroporation wurden die erhaltenen Klone selektioniert und mittels Kolonie-PCR charakterisiert (siehe Kapitel 2.5.15.1).

3.2 Methoden zur Mutagenese von *C. glutamicum*

Für die Entwicklung geeigneter Methoden zur Charakterisierung der Deletionsstämme wurden verschiedene Versuchsabläufe mit den unterschiedlichen Mutagenen getestet. Die endgültigen Versuchsabläufe können Kapitel 2.8 entnommen werden. Die Vorversuche zu den Mutagenese-Experimenten wurden ausschließlich mit dem Wildtyp von *C. glutamicum* ATCC 13032 durchgeführt. Es wurden immer die Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.2.1 UV-Mutagenese

UV-Strahlung verursacht in erster Linie CPDs, die zum Abbruch der Replikation oder Translation führen können (siehe 1.2.2.1). Die Untersuchung der Stämme auf ihre Sensibilität gegenüber UV-Strahlung wurde mit einem Plattentest durchgeführt. Diese Methode erwies sich als genau und gut reproduzierbar. Die Vorversuche mit *C. glutamicum* hatten gezeigt, dass eine Bestrahlung mit 0 bis 100 J/m² geeignet war. Es wurde ein Intervall von 20 J/m² gewählt. Die anfänglich großen Schwankungen in den Ergebnissen konnten dadurch unterbunden werden, indem die UV-Lampe des Stratalinkers vorgewärmt wurde.

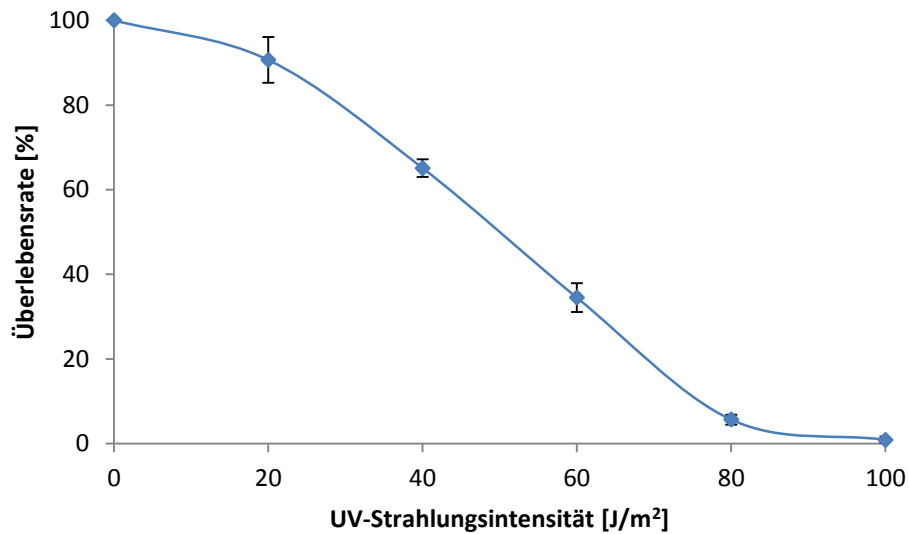


Abbildung 19: Ergebnis der UV-Mutagenese von *C. glutamicum* ATCC 13032

Etwa 500 bis 1000 Zellen von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und anschließend verschiedenen UV-Strahlungsintensitäten ausgesetzt. Nach Inkubation für zwei Tage bei 30 °C wurden die heranwachsenden Kolonien ausgezählt und die Überlebensraten bei steigender Strahlen-Dosis bestimmt. Angegeben sind hier und im Folgenden (Abbildung 20 bis Abbildung 38) die Mittelwerte der Überlebensraten aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken.

3.2.2 Zeocin-Mutagenese

Wie in Kapitel 1.2.2.2 beschrieben, verursacht das Mutagen Zeocin Doppelstrangbrüche, die die Zelle schädigen. Auch diese Methode wurde als Plattentest durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Mengen Zeocin dem LB-Agar hinzugefügt. Nach verschiedenen Versuchen stellte sich heraus, dass Zeocin-Konzentrationen von 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 und 2 µg/ml die besten Resultate hervorbrachten. Da der LB-Agar direkt mit verschiedenen Volumina der Mutagen-Stammlösung versetzt wurde, mussten relativ große Intervalle zwischen den verschiedenen Zeocin-Konzentrationen gewählt werden, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Bei geringeren Unterschieden zwischen den Zeocin-Konzentrationen in den Agarplatten war die Reproduzierbarkeit aufgrund hoher Schwankungen in den Überlebensraten nicht gegeben.

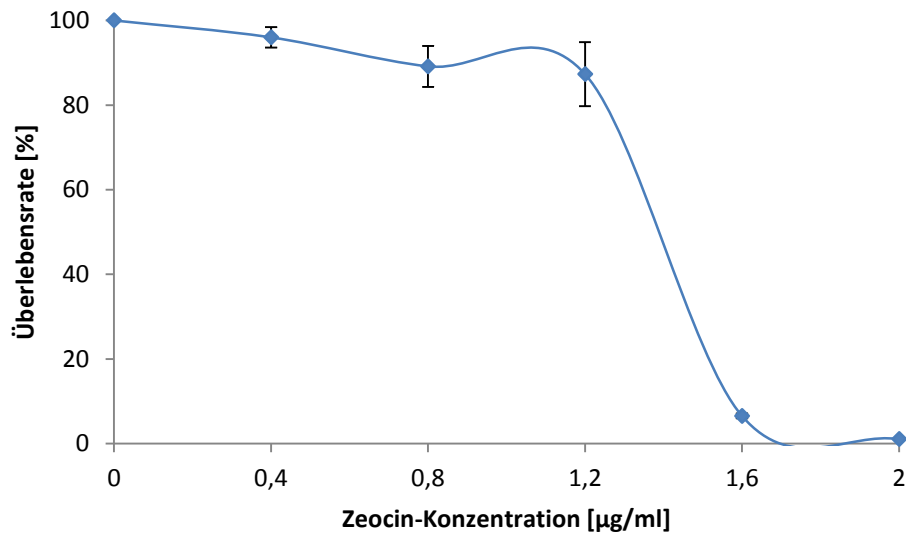


Abbildung 20: Resultat der etablierten Zeocin-Mutagenese von ATCC 13032

C. glutamicum ATCC 13032 wurde auf LB-Agarplatten, die mit verschiedenen Konzentrationen von Zeocin versetzt waren, ausplattiert. Die angewachsenen Kolonien gaben Aufschluss über die Überlebensraten bei steigender Zeocin-Dosis im Vergleich zur unbehandelten Probe.

3.2.3 Mitomycin C-Mutagenese

Das zytotoxische Antibiotikum Mitomycin C (MMC) reagiert mit Desoxyguanosin zu einem MMC-mono-Addukt. Dieses kann mit einem zweiten Desoxyguanosin zu einer Intrastrangverbindung an GG-Positionen oder einer Interstrangverbindung weiter reagieren. Somit werden die beiden DNA-Stränge kovalent verbunden. Hierdurch werden die Replikation und auch die Translation gehemmt. Um die einzusetzende Menge des sehr toxischen MMC so gering wie möglich zu halten, wurde eine Methode angewandt, bei der das Mutagen erst unmittelbar vor dem Ausplattieren zu den Zellen gegeben wurde (siehe Kapitel 2.8.3). Somit wurde auch nur die Menge Zellen-Mutagen-Lösung hergestellt, die für die Plattierung nötig war. Hierbei wurden ebenfalls zunächst verschiedene Konzentrationen an Mitomycin C getestet. Letztendlich wurde das Mutagen in Konzentrationen von 0; 25; 50; 75 und 100 µg/ml zu den Zellen gegeben. Bei der Methodenentwicklung stellte sich außerdem heraus, dass die LB₀-Platten nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C nur am Rand Kolonien hervorbrachten. Die Bereiche, in denen der Mutagenese-Ansatz aufgetropft wurde, blieben frei von Kolonien.

Daran hat sich gezeigt, dass die Proben nach dem Aufbringen auf die Agarplatten schnellstmöglich ausplattiert werden sollten, um ein gleichmäßigeres Bewachsen der Platten hervorzurufen. Trotz der großen Kolonie-freien Bereiche auf den Agarplatten, war auch diese Methode gut reproduzierbar und wies nur geringe Schwankungen auf.

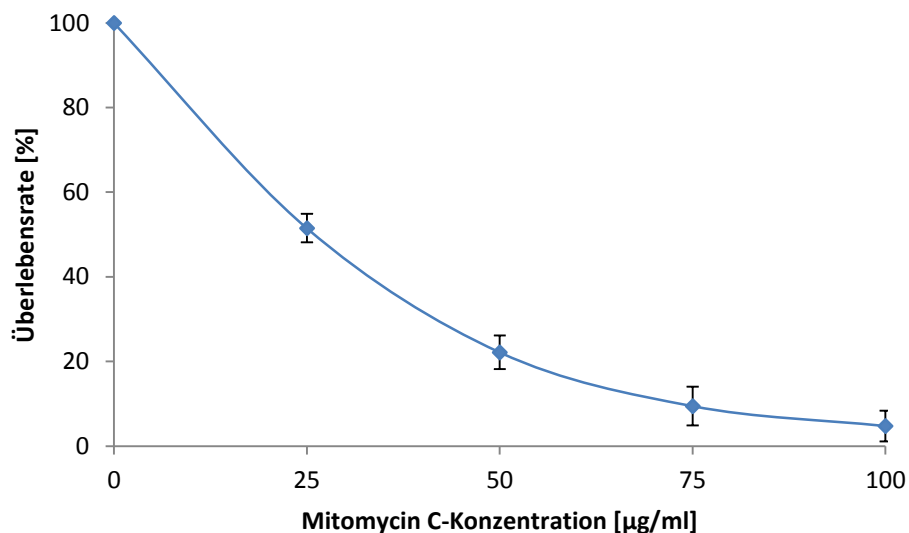


Abbildung 21: Überlebensraten von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach der Behandlung mit MMC

Verschiedene Konzentrationen vom MMC wurden zum Wildtyp-Stamm ATCC 13032 gegeben und die behandelten Zellen sofort auf LB₀-Platten plattiert. Nach 48 h bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Überlebensraten bei steigender MMC-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Probe bestimmt.

3.2.4 MNNG-Mutagenese

MNNG addiert Alkyl-Gruppen an das O⁶ der Base Guanin und an das O⁴ von Thymin. Diese Veränderung führt zu Transitionen. Für diese Mutagenese wurde eine Methode angewandt, die von Hopwood bereits beschrieben worden war (Hopwood *et al.* 1985). Zur Entwicklung des genauen Versuchsablaufs wurden erneut am Wildtyp von *C. glutamicum* verschiedene Bedingungen ausgetestet. Nach mehreren Tests mit unterschiedlichen MNNG-Konzentrationen und Inkubationszeiten, ergab sich, dass Konzentrationen von 0; 0,4; 0,8; 1,2 und 1,8 µg/ml MNNG am besten geeignet waren. Die Inkubationszeit von 1 h nach der Zugabe

des Mutagens zu den Zellen hat sich ebenfalls bewährt. Der genaue Versuchsablauf kann Kapitel 2.8.4 entnommen werden.

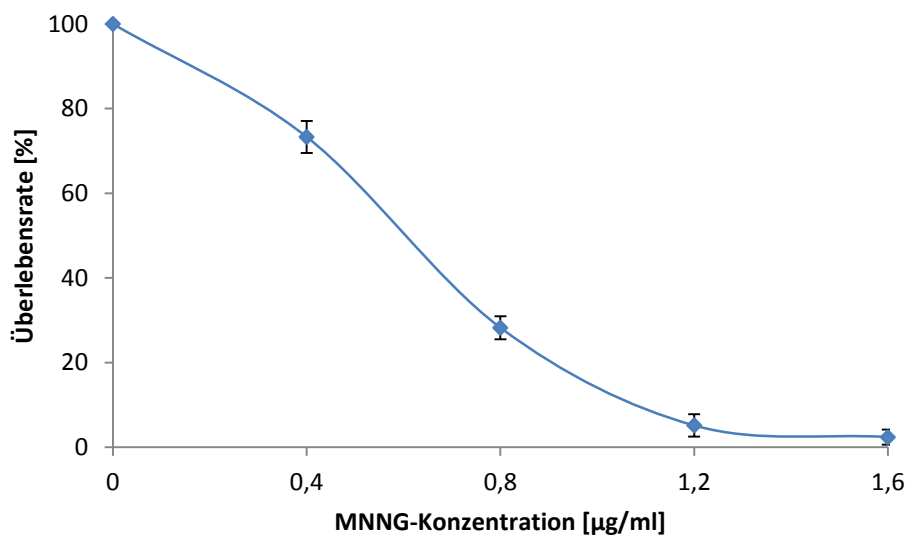


Abbildung 22: Ergebnis der MNNG-Mutagenese von *C. glutamicum* ATCC 13032

Der Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Behandlung mit verschiedenen MNNG-Dosen auf LB₀-Platten ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die angewachsenen Kolonien gezählt und die Überlebensraten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt.

3.3 Überlebensraten der Mutanten, die in der Direkten DNA-Reparatur betroffen sind
Bei dem Stamm FD4 ist das Gen *ogt* und bei dem Stamm FD15 das *alkB* Gen deletiert. Die Gene *ogt* und *alkB* sind Bestandteil der Direkten DNA-Reparatur. Die gleichnamigen Proteine sind an der Reversion, also der direkten Umkehr eines Schadens (siehe Kapitel 1.3.1), beteiligt. Bei AlkB handelt es sich um eine oxidative Demethylase. Sie entfernt Alkylierungen, welche durch eine S_N2-spezifische Reaktion verursacht wurden, aus der DNA. Die Alkyltransferase Ogt überträgt die zu entfernende Alkylgruppe auf einen eigenen Cysteinrest, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Beide Deletionsstämme zeigten phänotypisch keinen Unterschied zum Ausgangsstamm ATCC 13032. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 23 bis Abbildung 26) zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Mutagenesen anhand der Überlebensraten der einzelnen Stämme.

3.3.1 UV-Mutagenese

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Mutanten FD4 ($\Delta alkB$) und FD15 (Δogt) nach der Bestrahlung mit UV-Licht zu sehen.

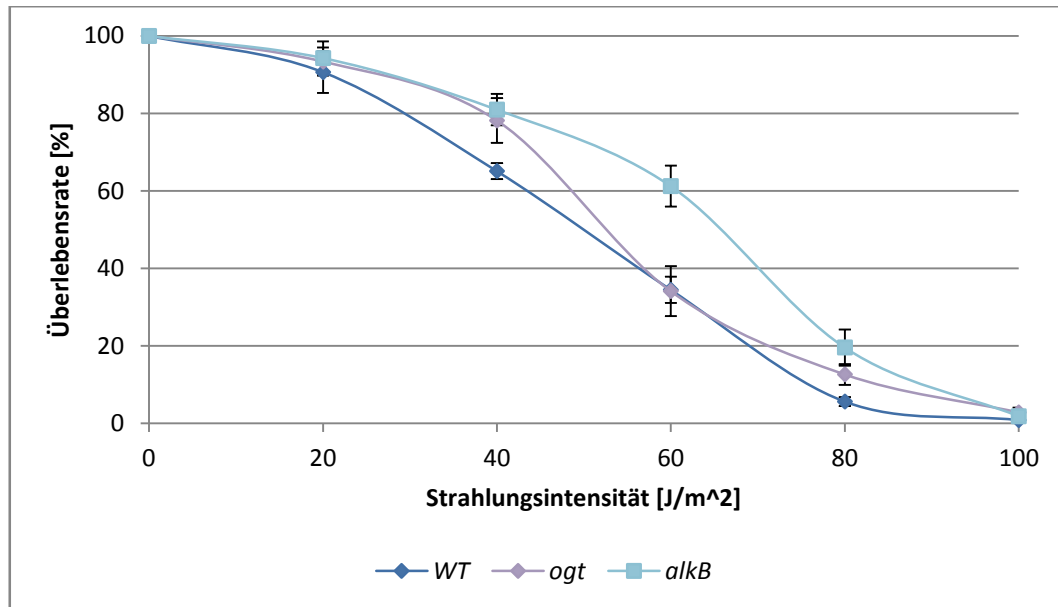


Abbildung 23: Überlebensraten der DR-Mutanten FD4 und FD15 bei zunehmender UV-Strahlungsintensität im Vergleich zum Referenzstamm *C. glutamicum* ATCC 13032

Das Diagramm zeigt die prozentualen Überlebensraten im Vergleich zur unbehandelten Probe der verschiedenen Stämme.

Nach der Behandlung mit UV-Strahlung zeigen die einzelnen Stämme verschiedene Empfindlichkeiten gegenüber dem Mutagen. Während bei FD4 die Deletion von *ogt* ähnliche Werte hervorbrachte wie der Wildtyp, hatte die Deletion von *alkB* in FD15 sogar einen positiven Einfluss auf die Resistenz gegenüber UV-Licht. Vor allem bei einer Strahlungsintensität von 60 J/m² wird dieser Effekt deutlich. Der Referenzstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 zeigte bei dieser Strahlen-Dosis im Durchschnitt eine Überlebensrate von etwa 37 %. Auch der Wert der *ogt*-Mutante lag in diesem Bereich (34,5 %). Die Deletion von *alkB* hingegen führte dazu, dass bei dieser UV-Dosis noch über 60 % der Zellen überleben. Bei höheren Strahlungsintensitäten (80 und 100 J/m²) näherten sich die Überlebensraten der drei Stämme allerdings wieder an. Eine UV-Lichtintensität von 100 J/m² war sowohl für den Wildtyp als auch für die beiden Deletionsstämme der Direkten Reparatur lethal. Die Standardabweichung in den Messungen lag bei maximal 7 %.

3.3.2 Zeocin-Mutagenese

Die Stämme FD4 ($\Delta alkB$) und FD15 (Δogt) wurden auch auf ihre Überlebensfähigkeit nach der Behandlung mit Zeocin untersucht. Die Ergebnisse dieser Mutagenese sind in Abbildung 24 zu sehen.

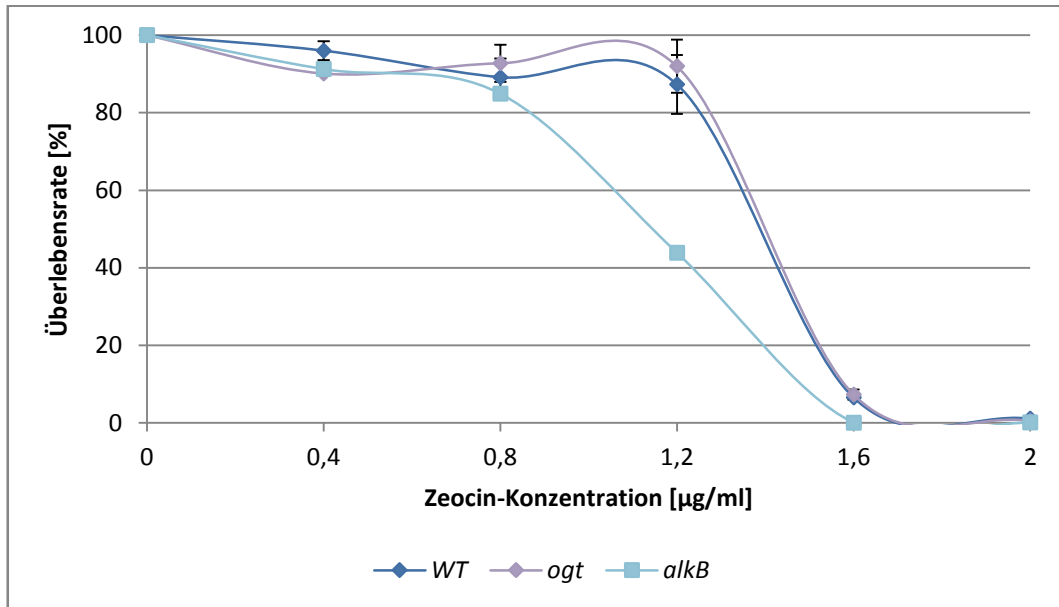


Abbildung 24: Überlebensraten der DR-Mutanten von *C. glutamicum* Δogt und $\Delta alkB$ in Abhängigkeit der zugegebenen Zeocin-Menge im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032

Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen Überlebensraten des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 und den Deletionsmutanten FD4 (Δogt) und FD15 ($\Delta alkB$) aus 3 unabhängigen Experimenten.

Bei der Mutagenese mit Zeocin wurde deutlich, dass die Deletion der oxidativen Demethylase AlkB in FD15 zu einer größeren Sensitivität gegenüber Zeocin führte. Während der Wildtyp und die *ogt*-Mutante bei 1,2 µg/ml Zeocin noch zu etwa 90 % überlebten, sank die Überlebensrate bei FD4 bei dieser Konzentration bereits auf etwa 40 %. Nach der Zugabe von 1,6 µg Zeocin pro ml überlebten außerdem noch ungefähr 7 % des Wildtyps und der *ogt*-Mutante, während bei FD15 ohne AlkB keine Kolonien mehr erhalten wurden (<0,1 %). Ab 2 µg/ml Zeocin wurden aber auch für den Referenzstamm ATCC 13032 und den *ogt*-Deletionsstamm keine Kolonien mehr erhalten (<0,1 %).

3.3.3 Mitomycin-Mutagenese der DR-Mutanten

Die Auswirkungen des Mutagens MMC auf die Überlebensfähigkeit der Mutanten FD4 und FD15 wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse dieser Mutagenese sind in Abbildung 25 dargestellt.

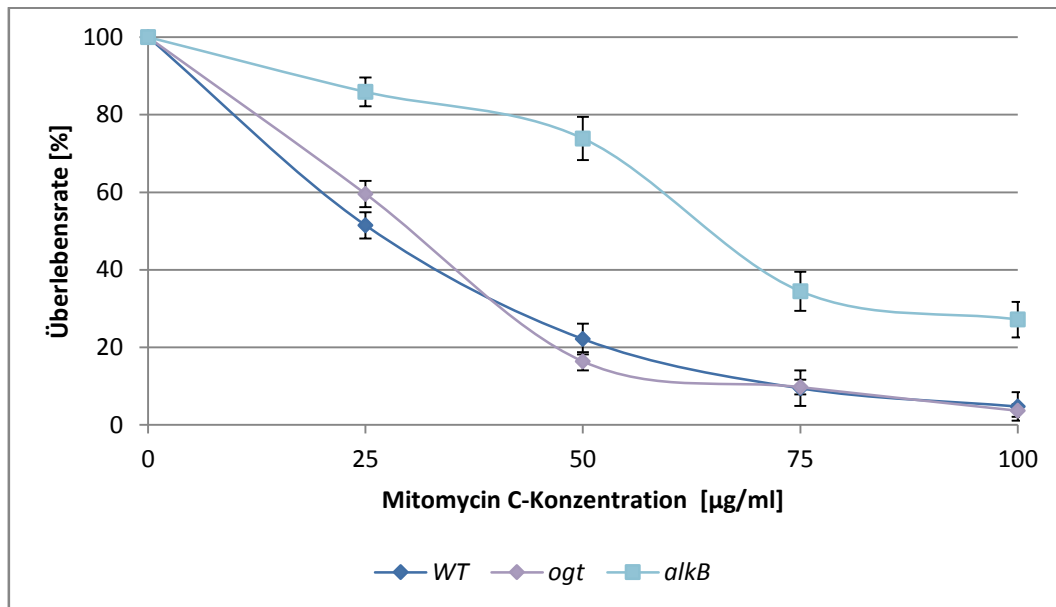


Abbildung 25: Überlebensraten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und den Mutanten *ogt* und *alkB* nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von MMC

Durch Auszählen der herangewachsenen Kolonien wurden die Überlebensraten der verschiedenen Stämme bestimmt. Das Diagramm zeigt die gemittelten Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der Mitomycin C-Mutagenese zeigten, dass die Deletion von *alkB* die Überlebensrate von FD15 signifikant erhöhte. Der Wildtyp von *C. glutamicum* und die *ogt*-Mutante verhielten sich sehr ähnlich. Die Zugabe von 50 µg/ml der Mutagens Mitomycin C überlebten nur etwa 20 % der Zellen dieser beiden Stämme. Bei dem *alkB*-Stamm war die Anzahl an Kolonien hingegen nur um etwa 25 Prozentpunkte reduziert. Und auch bei anderen MMC-Konzentrationen zeigte dieser Stamm eine geringere Empfindlichkeit gegenüber diesem Mutagen. So war die Überlebensrate der Zellen dieses Stammes bei anderen Mitomycinkonzentrationen im Durchschnitt um ca. 27 Prozentpunkte erhöht.

3.3.4 MNNG-Mutagenese der Mutanten FD4 und FD15

Die Antwort der Deletionsmutanten auf die Behandlung mit MNNG im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 ist in Abbildung 26 dargestellt.

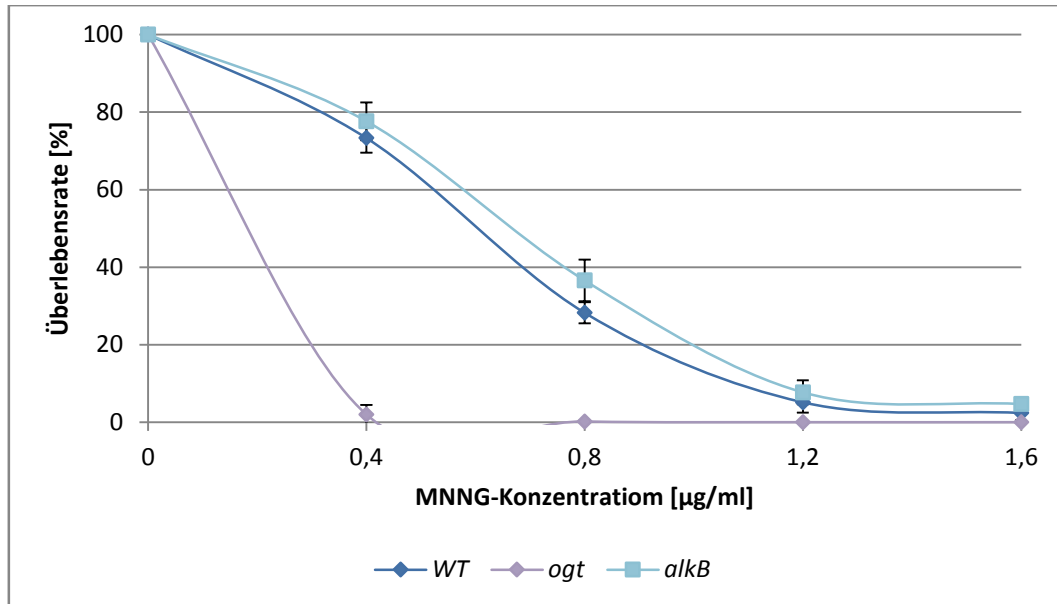


Abbildung 26: Überlebensraten des Referenzstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 und der Deletionsmutanten von *ogt* und *alkB* nach der Mutagenese mit MNNG

Die ermittelten Prozentwerte sind gegen die steigende MNNG-Konzentration aufgetragen.

Im Falle der Mutagenese mit MNNG hatte die Deletion von *alkB* keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Dieser Stamm verhielt sich wie der Wildtyp. Der Verlust der Alkyltransferase Ogt im Stamm FD15 hingegen erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber MNNG enorm. Schon eine MNNG-Konzentration von 0,4 µg/ml führte dazu, dass durchschnittlich nur noch 2 % der Zellen überlebten. Im Vergleich dazu tolerierten 74 % der Zellen des Referenzstammes ATCC 13032 und 77 % der Zellen der *alkB*-Mutante diese MNNG-Dosis. Erst bei einer Konzentration von 1,6 µg/ml des Mutagens reduzierte sich die Anzahl an Kolonien auf weniger als 5 %.

3.4 Auswirkungen der Deletion von Genen aus der Basenexzisionsreparatur

Es wurden mehrere Gene aus dem Reparaturweg der BER deletiert. Dabei handelte es sich um *alkA*, *mutM*, *ung*, *nei*, *nth*, *tagI*, *mutY* und *xth*. Alle diese Gene codieren für ihr gleichnamiges

Protein und ihre genaue Funktion kann Kapitel 1.3.2 entnommen werden. In ihrem Wachstum oder Phänotyp zeigten diese Deletionsmutanten keinerlei Veränderung zum Wildtyp ATCC 13032. Die Ergebnisse zur Untersuchung der BER in *C. glutamicum* wurden bereits veröffentlicht (Kautzmann und Altenbuchner 2017).

3.4.1 UV-Mutagenese

In Abbildung 27 A und B sind die Resultate der UV-Mutagenese der Mutanten aus der BER zu sehen. Die einzelnen Mutanten wurden zur besseren Übersicht in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (Abbildung 27 A) enthält die Stämme FD2 ($\Delta alkA$), FD10 ($\Delta tagI$), FD12 ($\Delta mutY$), FD11 ($\Delta tagI\Delta alkA$) und FD13 ($\Delta tagI\Delta alkA\Delta mutY$) mit Deletionen von jeweils einem, zwei oder drei Genen für die 3-Methyladenin- bzw. Adenin-Glykosylasen AlkA, TagI und MutY, sowie die Stämme FD5 ($\Delta mutM$) und FD6 (Δung), welchen die Formamidopyrimidin-Glykosylase MutM und die Uracil-DNA-Glykosylase Ung fehlte. Die zweite Gruppe (Abbildung 27 B) enthält die Mutanten FD8 (Δnei) und FD9 (Δnth) mit Deletionen für die Endonukleasen Nei und Nth sowie deren Doppelmutante FD14 ($\Delta nei/\Delta nth$) und den Stamm FD19 mit der Deletion des Gens *xth*, welches für die Exonuklease Xth codiert.

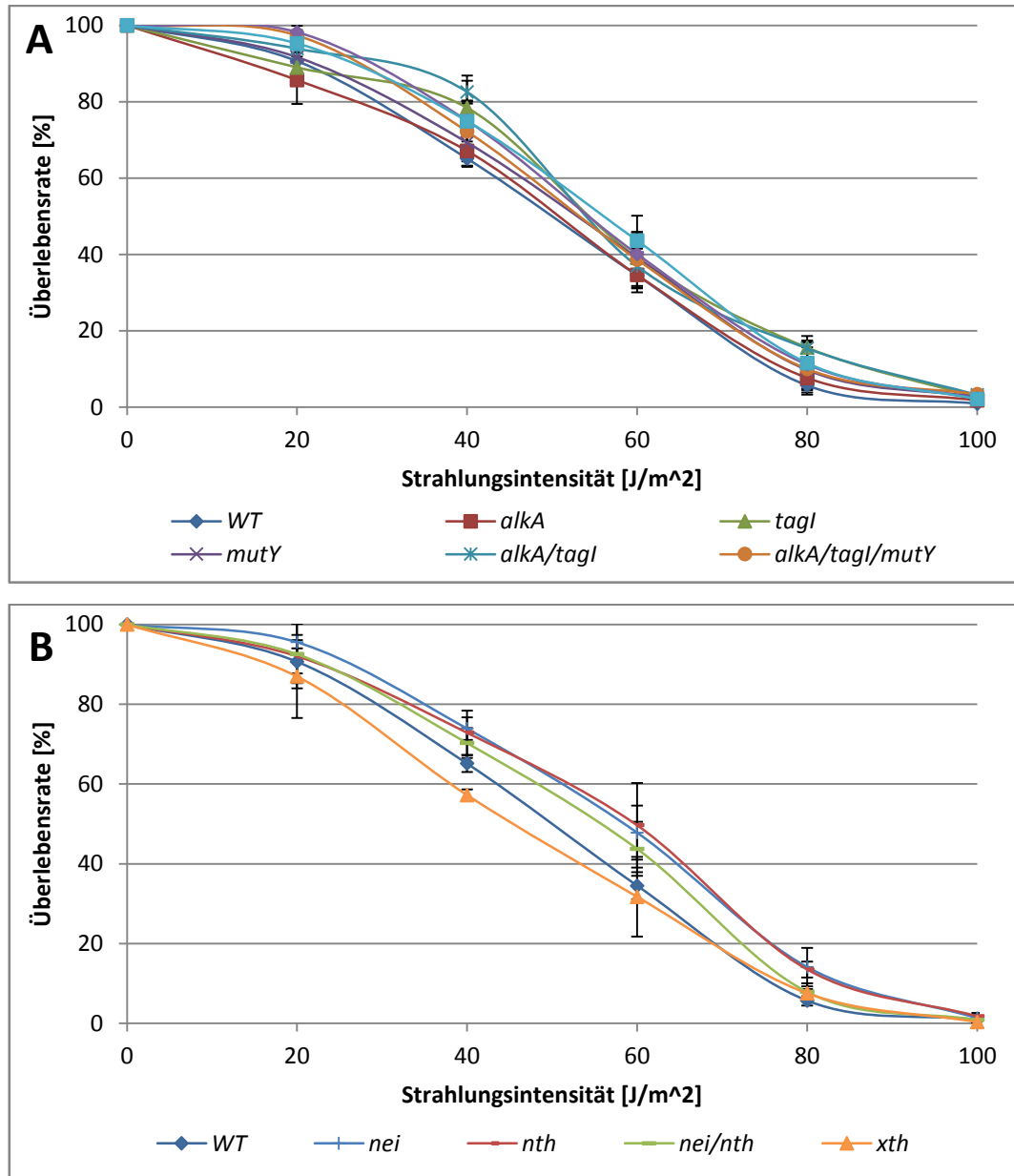


Abbildung 27: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten

mit Deletion von Genen der Basenexzisionsreparatur nach UV-Bestrahlung

(A) Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten $\Delta alkA$, $\Delta tagI$, $\Delta mutY$, $\Delta alkA/tagI$, $\Delta alkA/tagI/mutY$, $\Delta mutM$ und Δung . (B) Werte des Referenzstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 und der Mutanten Δnei , Δnth , $\Delta nei/nth$ und Δxth .

Das Diagramm mit den Ergebnissen der verschiedenen Glykosylasen (Abbildung 27 A) zeigt, dass die Mutanten ähnliche Überlebensraten aufweisen wie der Wildtyp. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp von *C. glutamicum*

feststellbar. Die maximale Standardabweichung der einzelnen Überlebensraten lag bei etwa 10 %, so dass sich die Werte größtenteils überlappten. In Abbildung 27 B zeichnet sich ab, dass die Mutanten der Endonukleasen Nei und Nth (sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutante) im Durchschnitt eine leichte Verbesserung der Überlebensrate (8 bis 15 Prozentpunkte) aufwiesen. Allerdings überlappten sich auch hier die Werte aus den einzelnen Experimenten. Insgesamt nahm die Überlebensrate mit zunehmender Strahlungsintensität ab. Bei einer Dosis von 60 J/m^2 überlebten noch etwa 40 % der Zellen. UV-Strahlung mit einer Intensität von 100 J/m^2 wurde von keinem Teststamm mehr toleriert.

3.4.2 Zeocin-Mutagenese

Inwiefern die Mutanten der BER auf die Behandlung mit Zeocin reagieren, wurde in diesem Experiment untersucht. In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse dieser Mutagenese dargestellt. Wie in Kapitel 3.4.1 wurden die Ergebnisse zur besseren Übersicht in zwei Gruppen eingeteilt.

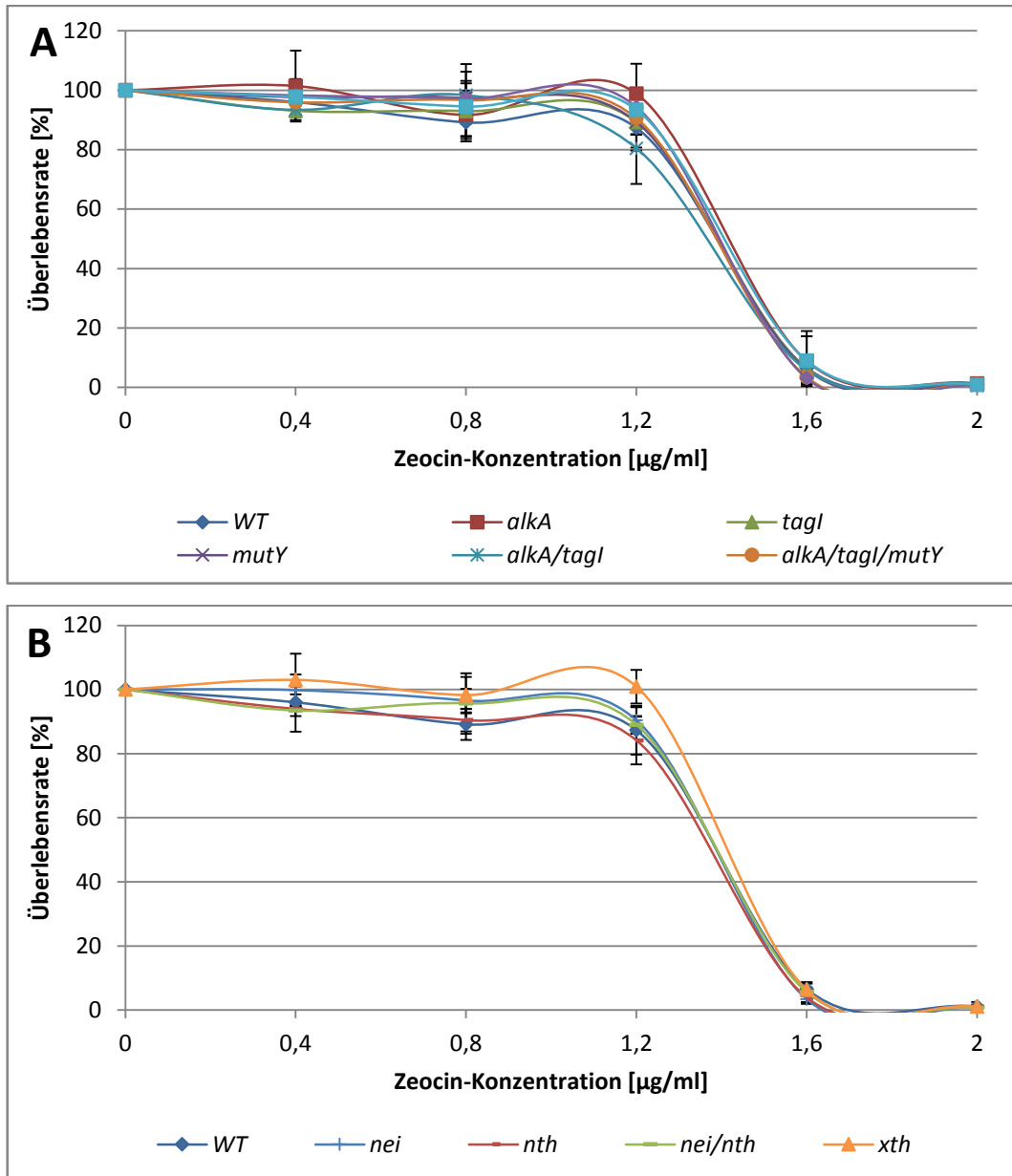


Abbildung 28: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion von Genen der Basenexzisionsreparatur nach Behandlung mit steigenden Zeocin-Mengen

Die Diagramme A und B zeigen die ermittelten Überlebensraten der verschiedenen Stämme nach Zugabe steigender Zeocin-Mengen. **(A)** Werte des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten $\Delta alkA$, $\Delta tagI$, $\Delta mutY$, $\Delta alkA/tagI$, $\Delta alkA/tagI/mutY$, $\Delta mutM$ und Δung . **(B)** Ergebnisse des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten Δnei , Δnth , $\Delta nei/nth$ und Δxth .

Nach der Behandlung der verschiedenen Stämme mit Zeocin zeigte sich auch hier, dass die verschiedenen Mutanten ähnlich empfindlich gegenüber dem Mutagen waren wie der Wildtyp ATCC 13032. Bis zu einer Konzentration von 1,2 µg/ml schwankten die Werte zwischen 90 und 100 %. Nach der Zugabe von 1,6 µg/ml betrugen dagegen die Überlebensraten im Schnitt nur noch 6 %. Wurde die Zeocin-Konzentration noch weiter erhöht, konnten kaum noch Klone gezählt werden.

3.4.3 Mitomycin C -Mutagenese

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 29 A und B) sollen zeigen, wie die Deletionen von Reparaturgenen aus der BER die Reaktion der Teststämme auf die mutagene Wirkung von MMC veränderten. Auch hier wurden wieder die Stämme in zwei Gruppen eingeteilt.

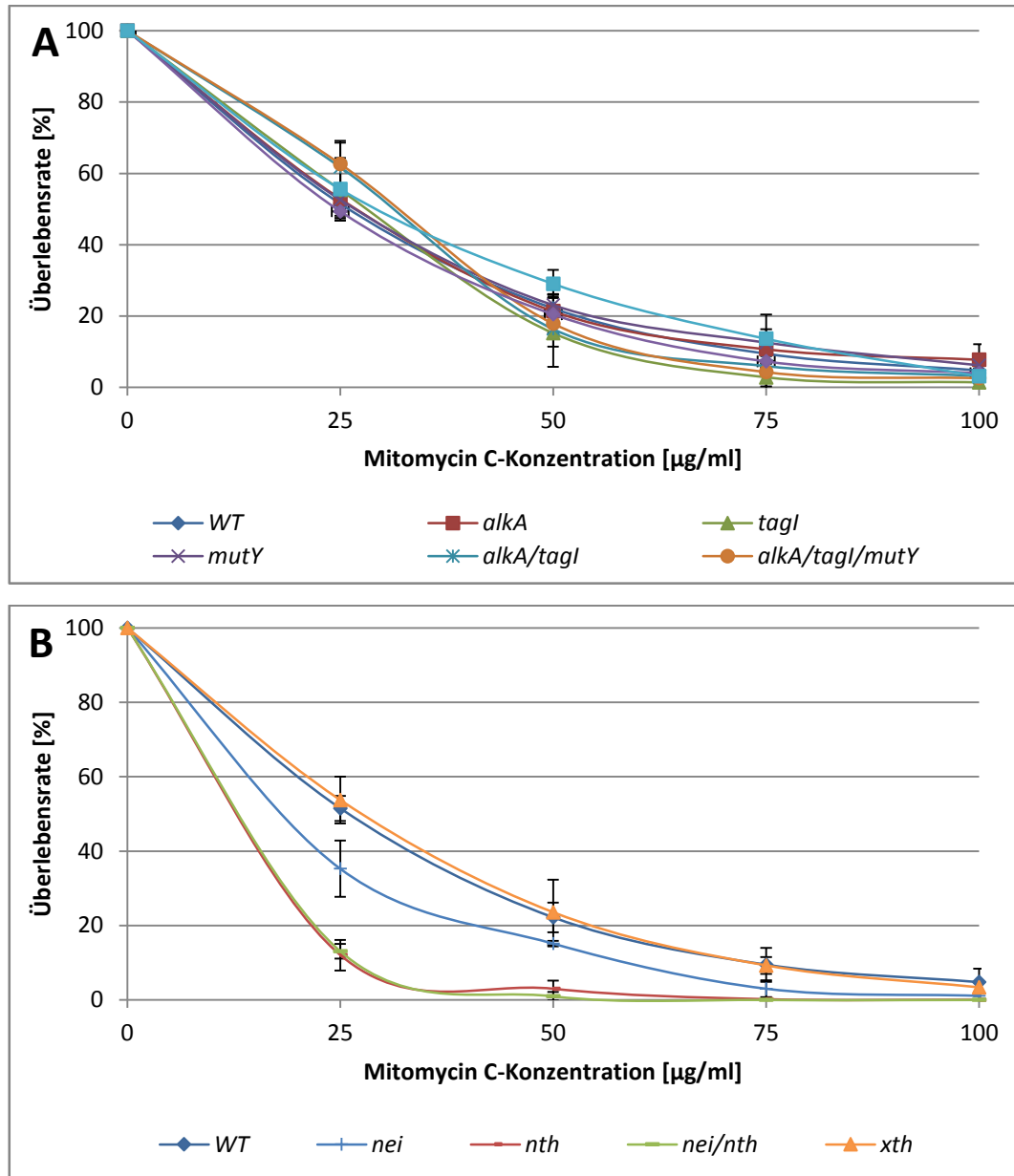


Abbildung 29: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion von Genen der Basenexzisionsreparatur bei verschiedenen Mitomycin C-Konzentrationen

(A) Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten $\Delta alkA$, $\Delta tagl$, $\Delta mutY$, $\Delta alkA/tagl$, $\Delta alkA/tagl/mutY$, $\Delta mutM$ und Δung . (B) Ergebnisse des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten Δnei , Δnth , $\Delta nei/nth$ und Δxth .

Die Zugabe des Mutagens Mitomycin C verursachte eine deutliche Abnahme der Überlebensraten sowohl von Wildtyp als auch der in BER-Genen betroffenen Mutanten. In Abbildung 29 A sind wieder die Überlebensraten der Adenin-Glykosylase-deletierten Stämme

im Vergleich zum Wildtyp von *C. glutamicum* aufgetragen. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml lag die durchschnittliche Überlebensrate aller Stämme bei etwa 20 %. Die Werte der Einzelmutanten *alkA* und *mutY* wichen praktisch nicht von den Werten des Referenzstammes ATCC 13032 ab. Berücksichtigt man die Standardabweichungen, überschneiden sich die Werte aller Stämme.

Im Vergleich dazu führte die Deletion der Endonukleasen *Nei* und *Nth* zu einer deutlichen Abnahme der Überlebensraten nach der Zugabe von MMC (Abbildung 29 B). Bereits bei einer MMC-Konzentration von 25 µg/ml war die durchschnittliche Überlebensrate der Δnei -Mutante im Vergleich zum Wildtyp um über 16 Prozentpunkte reduziert. Im Falle der Deletion von *nth* lag die Überlebensrate knapp 40 Prozentpunkte unter der des Wildtyps. Die Werte der Δnei -Mutante blieben auch bei höheren MMC-Konzentrationen etwa 5 Prozentpunkte unter den Werten des Referenzstammes ATCC 13032. Die Mutante ohne *nth* war nochmals deutlich empfindlicher gegenüber MMC. Bei 50 µg/ml MMC bildeten lediglich 3 % der Zellen Kolonien. Stieg die MMC-Konzentration weiter an, gab es keine Kolonien mehr. Die Doppelmutante mit der Deletion von *nei* und *nth* zeigte dasselbe Ergebnis wie die Δnth -Mutante. Die Deletion des Gens für die Exonuklease *Xth* hatte keine Auswirkung auf das Überleben der Zellen bei Behandlung mit MMC.

3.4.4 MNNG-Mutagenese

Ob Mutationen, hervorgerufen durch MNNG, die Überlebensfähigkeit der Stämme mit Deletionen in den Genen der BER beeinflussen, sollte hier gezeigt werden. Die Abbildung 30 A und B fassen die Ergebnisse dieser Mutagenese zusammen.

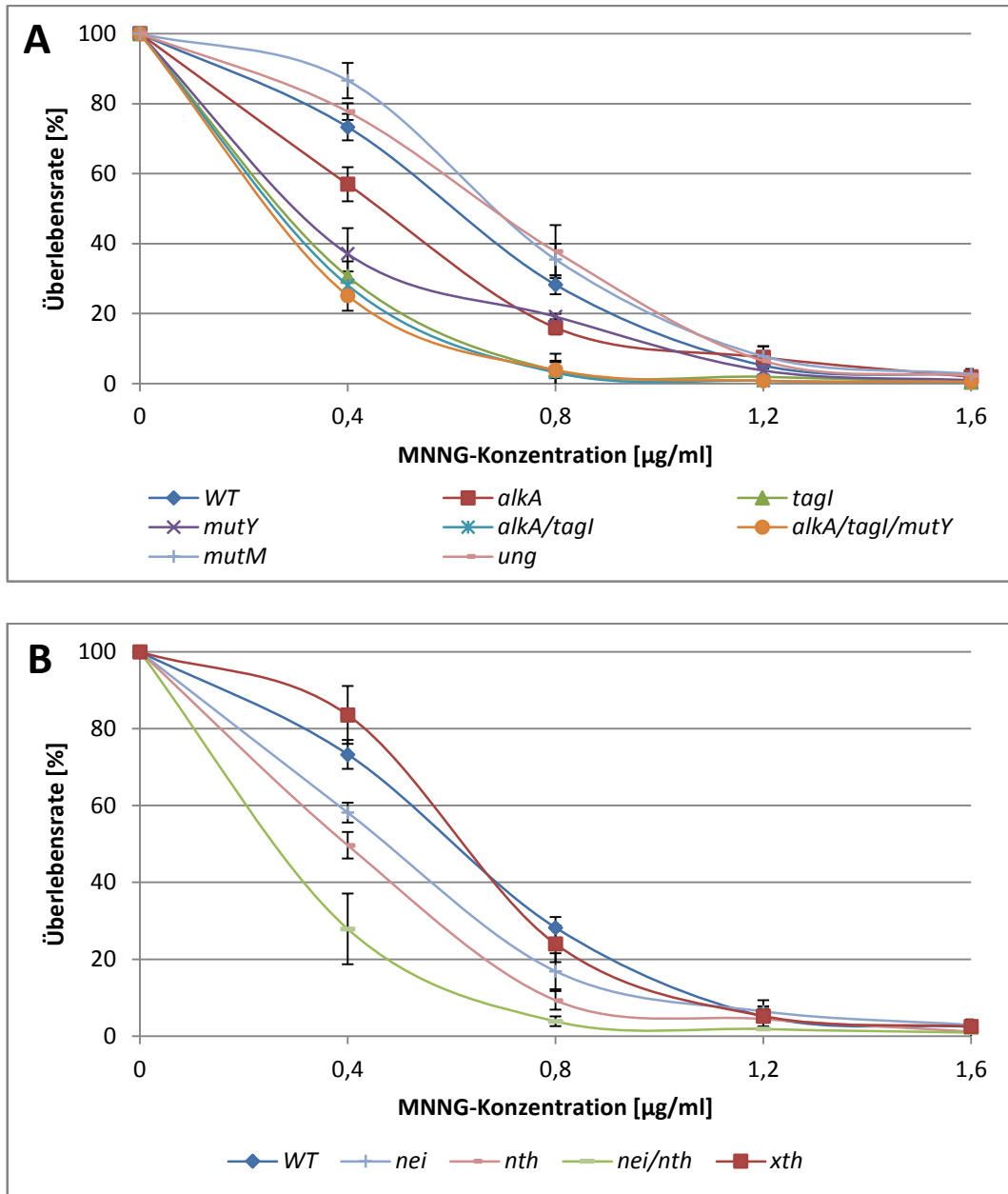


Abbildung 30: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion von Genen der Basenexzisions Reparatur nach Behandlung mit MNNG

(A) Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten $\Delta alkA$, $\Delta tagI$, $\Delta mutY$, $\Delta alkA/tagI$, $\Delta alkA/tagI/mutY$, $\Delta mutM$ und Δung . (B) Ergebnisse des Wildtyps ATCC 13032 und der Deletionsmutanten Δnei , Δnth , $\Delta nei/nth$ und Δxth .

Wie in Abbildung 30 A zu sehen ist, führte die Zugabe von MNNG zu einer signifikant erhöhten Reduktion der Kolonien bei den Deletionsmutanten im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 13032. Bei einer MNNG-Konzentration von 0,4 µg/ml bildeten noch 73,3 % der Zellen des

Wildtyps Kolonien. Fehlte in der Mutante die 3-Methyladenin-Glykosylase AlkA, lag dieser Wert im Vergleich bei knapp 60 %. Bei gleicher MNNG-Konzentration verringerte die Deletion von *mutY* die durchschnittliche Überlebensrate auf 37 %. Noch deutlichere Auswirkung hatte die Deletion von *tagI*. Hier waren nur noch 30 % der Zellen überlebensfähig. Auch die Mehrfachmutanten $\Delta alkA/tagI$ und $\Delta alkA/tagI/mutY$ zeigten diese deutlich erhöhte Sensibilität gegenüber MNNG. Die Überlebensraten dieser Stämme lagen im Bereich der $\Delta tagI$ -Einzelmutante. Die durchschnittlichen Überlebensraten der Mutanten ohne *MutM* und *Ung* waren bei einer MNNG-Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ zunächst etwas höher als die des Wildtyps. Auch nach der Zugabe von 0,8 $\mu\text{g/ml}$ des Mutagens waren die Überlebensraten der *mutM*- und *ung*-Mutanten im Durchschnitt um 7 bzw. 9 Prozentpunkte erhöht.

In Abbildung 30 B sind die Überlebensraten der Deletionsmutanten von *nei* und *nth* nach Wachstum bei verschiedenen MNNG-Konzentrationen aufgetragen. Auch hier führten die einzelnen Deletionen zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber dem Mutagen. Durch die Deletion des Endonukleasegens *nei* aus dem Genom verringerte sich die Zahl der überlebenden Zellen bei einer MNNG-Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ um 15 Prozentpunkte gegenüber dem Referenzstamm. Die Überlebensrate der Δnth -Mutante war gegenüber der des Δnei -Stammes um weitere ca. 8 Prozentpunkte reduziert, entsprechend war die Rate gegenüber dem Referenzstamm ATCC 13032 sogar um 23 Prozentpunkte verringert. Waren beide Endonuklease-Gene deletiert, erhöhte sich dieser Wert nochmals deutlich, die Überlebensrate betrug 28 % im Vergleich zu 73 % bei dem Wildtyp. Die Mutante Δxth zeigte nach der Behandlung mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ MNNG zunächst ein verbessertes Überleben. Durch Zugabe der nächsthöheren Mutagen-Dosis fiel auch bei diesem Stamm der Wert auf 25 % ab und lag somit im Bereich des Wildtyps.

3.5 Auswirkung von Mutagenen auf *C. glutamicum* Stämme mit Mutationen in Genen der Nukleotidexzisionsreparatur

Die NER ist in erster Linie für die Reparatur UV-induzierter Schäden zuständig. Um zu zeigen, welche Arten von Schäden die Überlebensfähigkeit der Zellen mit Mutationen in den Genen der NER in *C. glutamicum* beeinflussen, wurden die Stämme FD1 ($\Delta uvrD$) und FD3 ($\Delta uvrA$)

herangezogen und mit den vier Mutagenen (UV-Licht, Zeocin, MMC und MNNG) behandelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Mutagenesen dargestellt.

3.5.1 UV-Mutagenese

Die Reparatur von Schäden, die durch UV-Strahlung verursacht werden, wird in *E. coli* durch die NER katalysiert. Die etablierte Methode der UV-Licht-Mutagenese musste hierfür etwas modifiziert werden. Für die UV-Licht-Mutagenese der Mutanten der NER wurden geringere Strahlungsintensitäten gewählt. Nachdem schon bei der bisher verwendeten geringsten Dosis (10 J/m²) keine Bakterienkolonien mehr auf den LB-Agarplatten wuchsen, stellten sich hier Strahlungsintensitäten von 0 bis 5 J/m² als geeignet heraus. Die folgende Abbildung (Abbildung 31) zeigt die Ergebnisse der UV-Mutagenese mit den Stämmen FD1 (ohne die Helikase UvrD) und FD3 (ohne die Excinuklease ATPase Untereinheit UvrA).

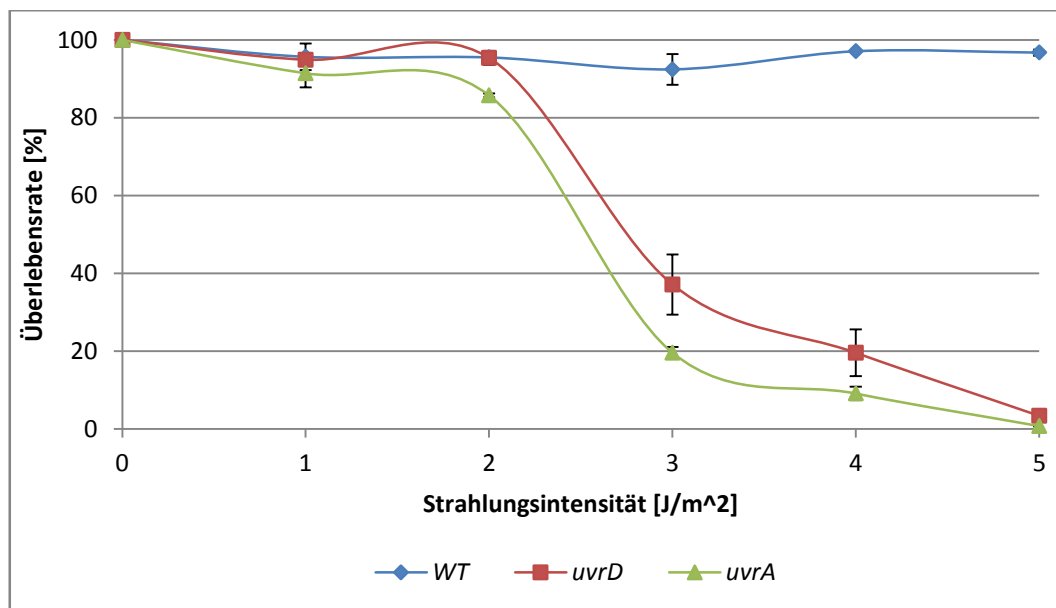


Abbildung 31: Überlebensraten des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 und der davon abgeleiteten Mutanten FD1 ($\Delta uvrD$) und FD3 ($\Delta uvrA$)

Die berechneten durchschnittlichen Überlebensraten aus 3 unabhängigen Experimenten wurden gegen die steigende Strahlen-Dosis aufgetragen.

Die Ergebnisse der Bestrahlung der verschiedenen Stämme (Wildtyp, $\Delta uvrD$, $\Delta uvrA$) mit UV-Licht sind in Abbildung 31 zu sehen. Eine Strahlendosis von 0 bis 5 J/m² hatte keine Auswirkung auf die Überlebensraten des Referenzstammes ATCC 13032 und bis zu einer

Strahlungsintensität von 2 J/m^2 lagen die durchschnittlichen Überlebensraten der verschiedenen Mutanten auch noch eng beieinander. Bei einer Strahlungsintensität von 3 J/m^2 wurde der Unterschied jedoch deutlich. Bei der Mutante ohne *uvrD* konnten noch 37 % der Zellen Kolonien bilden. Bei der Mutante mit einer Deletion von *uvrA* waren dies noch 19 % der Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit 5 J/m^2 lag die durchschnittliche Überlebensrate bei 3,4 ($\Delta\textit{uvrD}$) bzw 0,7 % ($\Delta\textit{uvrA}$). Vom Wildtyp überlebten bei dieser Dosis hingegen noch etwa 97 %.

3.5.2 Zeocin-Mutagenese

Abbildung 32 zeigt die durchschnittlichen Überlebensraten der Stämme FD1 ($\Delta\textit{uvrD}$), FD3 ($\Delta\textit{uvrA}$) und des Wildtyps ATCC 13032 nach der Zugabe verschiedener Zeocin-Konzentrationen.

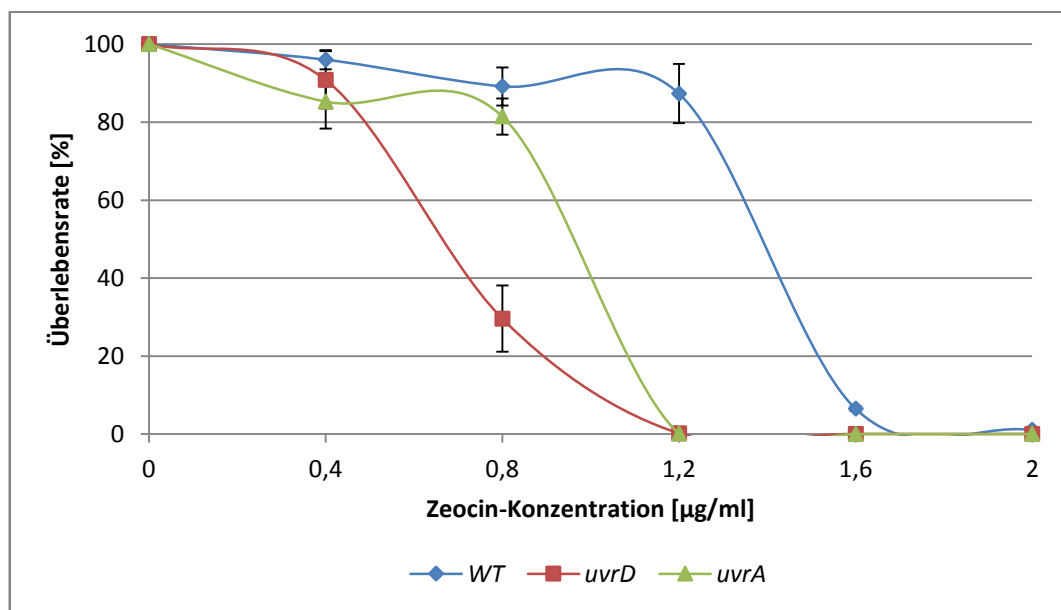


Abbildung 32: Überlebensraten des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 und der davon abgeleiteten Mutanten FD3 ($\Delta\textit{uvrD}$) und FD1 ($\Delta\textit{uvrA}$) nach dem Ausplattieren auf Zeocin

Es wurden die Durchschnittswerte im Vergleich zur unbehandelten Probe aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Bei dem Wachstum der drei Stämme bei unterschiedlichen Zeocin-Konzentrationen konnte man sehen, dass die Deletionen von *uvrA* bzw. *uvrD* zu einer verminderten

Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Referenzstamm führten (Abbildung 32). Während etwa 90 % der Zellen des Referenzstammes ATCC 13032 bei einem Gehalt von 0,8 µg/ml des Antibiotikums noch wuchsen, waren es lediglich knapp 30 % der Zellen der *uvrD*-Mutante. Im Vergleich dazu zeigte sich die *uvrA*-Mutante bei dieser Zeocin-Konzentration weniger empfindlich. Jedoch scheint auch diese Gendeletion einen Einfluss auf die Reparaturfähigkeit der durch Zeocin verursachten Doppelstrangbrüche zu haben. Lag die Mutagen-Konzentration bei 1,2 µg/ml, konnten keine Bakterienkolonien der *NER*-Deletionsstämme mehr nachgewiesen werden. Vom Wildtyp überlebten bei dieser Konzentration hingegen noch 87 %. Die Standardabweichung betrug hier maximal 8 %.

3.5.3 Mitomycin C-Mutagenese

Das folgende Ergebnis (Abbildung 33) zeigt den Einfluss der Deletion von *uvrA* bzw. *uvrD* auf die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum*, nach der Behandlung mit MMC.

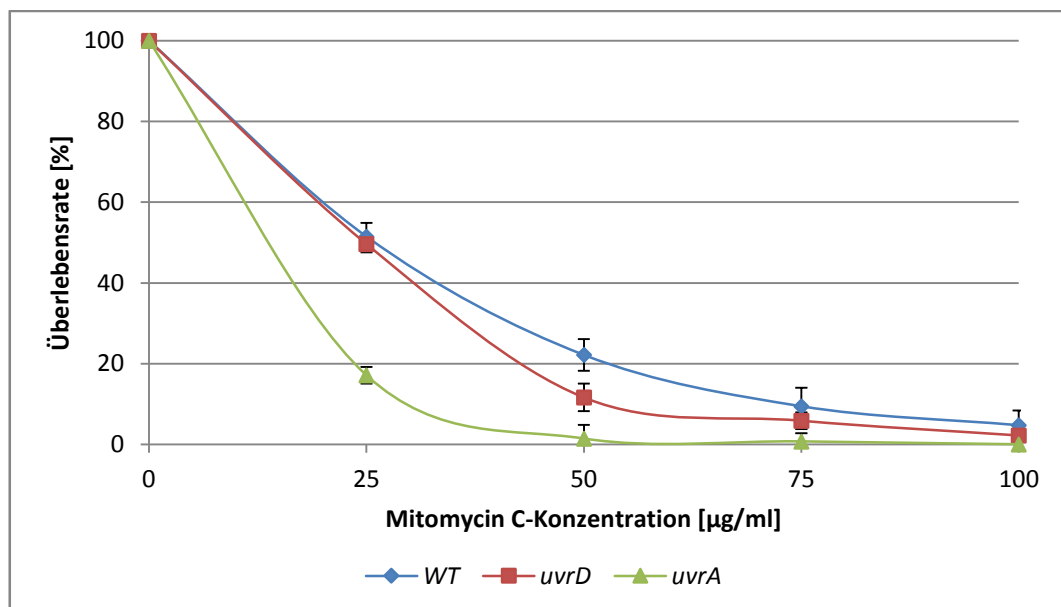


Abbildung 33: Überlebensraten des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 und der davon abgeleiteten Mutanten FD3 ($\Delta uvrD$) und FD1 ($\Delta uvrA$) nach Behandlung mit MMC

Im Diagramm sind die ermittelten Überlebensraten der Stämme ATCC 13032 (WT), FD1 ($\Delta uvrD$) und FD3 ($\Delta uvrA$) in Prozent aufgetragen.

Die Mitomycin C-Mutagenese zeigte, dass die Deletion von *uvrA* zu zu einer deutlich höheren Sensitivität gegen MMC führte. Bereits eine MMC-Konzentration von 25 µg/ml bewirkte, dass nur noch 12 % der Zellen Kolonien bilden konnten, wo hingegen die Hälfte der Zellen des Referenzstammes und der *uvrD*-Mutante diese Menge noch tolerierten. Wurde die MMC-Konzentration weiter erhöht, nahmen auch die Überlebensraten weiter ab. Bei 50 µg/ml MMC wuchsen noch 22% der Zellen des Wildtyps, 11% der $\Delta uv r D$ -Mutante und circa 1-2% der $\Delta uv r A$ -Mutante. Bei einem MMC-Gehalt von 75 µg/ml halbierten sich diese Zahlen für den Wildtyp und die $\Delta uv r D$ -Mutante noch einmal, von der $\Delta uv r A$ -Mutante wurden keine Kolonien mehr erhalten. Wurde die Dosis noch weiter auf 100 µg/ml erhöht, wurden von keinem der drei Stämme Kolonien erhalten.

3.5.4 MNNG-Mutagenese

Mittels MNNG-Mutagenese sollte hier der Einfluss der Deletionen von *uvrA* und *uvrD* auf die Reparatur von DNA-Schäden, die durch MNNG verursacht werden, untersucht werden. Die Überlebensraten der Mutanten und des Referenzstammes sind in Abbildung 34 dargestellt.

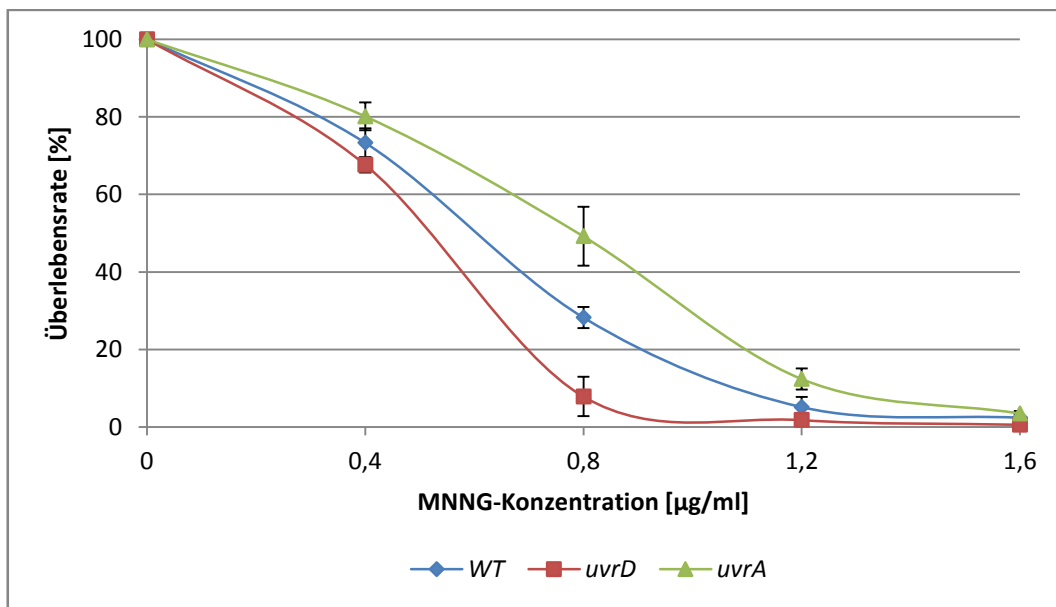


Abbildung 34: Überlebensraten des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 und der davon abgeleiteten Mutanten FD3 ($\Delta uv r D$) und FD1 ($\Delta uv r A$) nach Behandlung mit MNNG

Das Diagramm zeigt die berechneten Werte der Mutanten aus der NER.

Nach der Zugabe von 0,4 µg/ml MNNG war zu erkennen, dass die Deletion der beiden Gene einen Einfluss auf das Überleben der Stämme hatte. Dabei lagen die Werte des Referenzstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 in der Mitte zwischen den Werten der beiden Mutanten. Während $\Delta uvrA$ etwa 7 Prozentpunkte über dem Wildtyp lag, lag $\Delta uvrD$ 7 Prozentpunkte darunter. Die MNNG-Konzentration von 0,8 µg/ml verursachte durchschnittliche Werte, die 20 Prozentpunkte über ($\Delta uvrA$) bzw. unter ($\Delta uvrD$) dem Wert des Wildtyps lagen. Bei einer MNNG-Konzentration von 1,2 µg/ml nahmen die Überlebensraten weiter ab. Nur 5 % des Wildtyps waren hier überlebensfähig. Lediglich knapp 2 % der $\Delta uvrD$ -Mutante tolerierten diese Konzentration. Gleichzeitig waren immerhin noch 12 % der $\Delta uvrA$ -Mutante in der Lage zu überleben. Bei noch höherer MNNG-Konzentration, führte dies dazu, dass kaum noch Kolonien gebildet wurden. Je 3 % des Referenzstammes und von der *uvrA*-Mutante waren hier noch überlebensfähig. Die $\Delta uvrD$ -Mutante überlebte diese MNNG-Konzentration nicht.

3.6 Auswirkung von Mutagenen auf Mutanten in Genen der Rekombinationsreparatur

Die Rekombinationsreparatur kommt dann zum Einsatz, wenn beide Stränge der DNA von einem Schaden betroffen sind. In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung dieses Reparatursystems in *C. glutamicum* mehrere Gene deletiert, die an diesen Reparaturvorgängen beteiligt sind. Bei den erhaltenen Stämmen handelt es sich um FD7 ($\Delta recA$), FD16 ($\Delta adnAB$), FD17 ($\Delta recO$), FD20 ($\Delta recJ$), FD21 ($\Delta ruvB$), FD22 ($\Delta recG$), FD46 ($\Delta recB$) und FD47 ($\Delta recB/\Delta adnAB$).

3.6.1 UV-Mutagenese

Wie bei den Mutanten der NER wurden auch hier für die UV-Mutagenese geringere Strahlungsintensitäten verwendet, da die Stämme $\Delta recA$ und $\Delta recO$ schon bei der geringsten Strahlendosis von 10 J/m² keine Kolonien mehr hervorbrachten. Es erwies sich eine Strahlendosis zwischen 0 und 10 J/m² am geeignetsten für die Mutagenese. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der UV-Mutagenese der verschiedenen Deletionsmutanten von Genen der RR zusammengefasst.

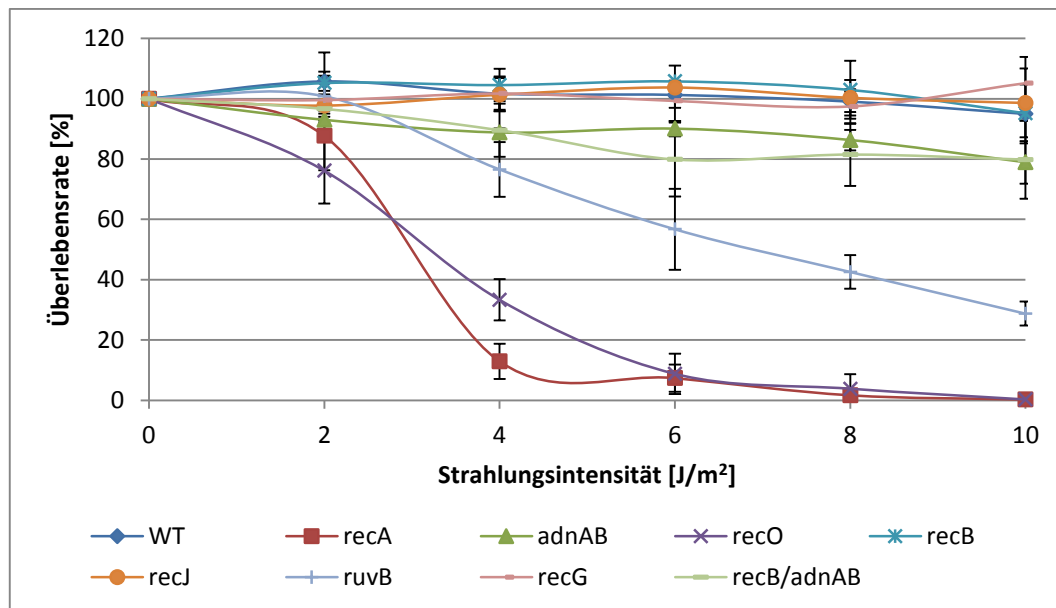


Abbildung 35: Überlebensraten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und den in der Rekombinationsreparatur betroffenen Mutanten nach der Behandlung mit UV-Licht

Die Überlebensraten der Stämme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden in Prozent gegen die steigende UV-Strahlendosis im Diagramm aufgetragen.

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, hatte die Bestrahlung der Zellen mit bis zu 10 J/m² keinen Einfluss auf das Überleben des Wildtyps ATCC 13032. Ebenso lagen die durchschnittlichen Werte der Deletionsmutanten $\Delta recG$, $\Delta recJ$ und $\Delta recB$ nach einer Bestrahlung mit 10 J/m² noch bei etwa 100 %. Wurde *adnAB* deletiert (sowohl einzeln, als auch gemeinsam mit *recB*), fiel die Überlebensrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei einer Strahlendosis von 10 J/m² auf 80 % ab. Noch deutlicher wirkte sich die UV-Strahlung auf die Mutante $\Delta ruvB$ aus. Bereits die Bestrahlung mit 4 J/m² führte dazu, dass nur noch ca. 76 % der Zellen vermehrungsfähig waren. Wurde die Strahlungsintensität weiter erhöht, nahmen die durchschnittlichen Überlebensraten weiterhin kontinuierlich ab, von 56 % bei 6 J/m² auf 27% bei 10 J/m². Am deutlichsten zeigte sich die Wirkung von UV-Strahlung bei den Deletionsmutanten von $\Delta recA$ und $\Delta recO$. Die durchschnittlichen Überlebensraten beider Stämme fielen im Vergleich zum Referenzstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 rapide ab. Während nach der Bestrahlung mit 2 J/m² der Wert der $\Delta recA$ -Mutante (knapp 88 %) zunächst noch über dem Wert der $\Delta recO$ -Mutante (76 %) lag, nahm die Zahl der überlebenden Zellen

bei weiterer Erhöhung der UV-Strahlendosis schneller ab. Wurden die Stämme mit 6 J/m² behandelt, so fiel die durchschnittliche Überlebensrate unter 10 %. Nach weiterer Erhöhung der Strahlungsintensität auf 8 J/m² fielen die Werte weiter auf unter 5 %.

3.6.2 Zeocin-Mutagenese

Die Wirkung des Mutagens Zeocin wurde hier genutzt um den Einfluss der Mutation der Gene der RR auf die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* zu untersuchen. Die ermittelten Überlebensraten im Vergleich zu den unbehandelten Proben sind im folgenden Diagramm dargestellt.

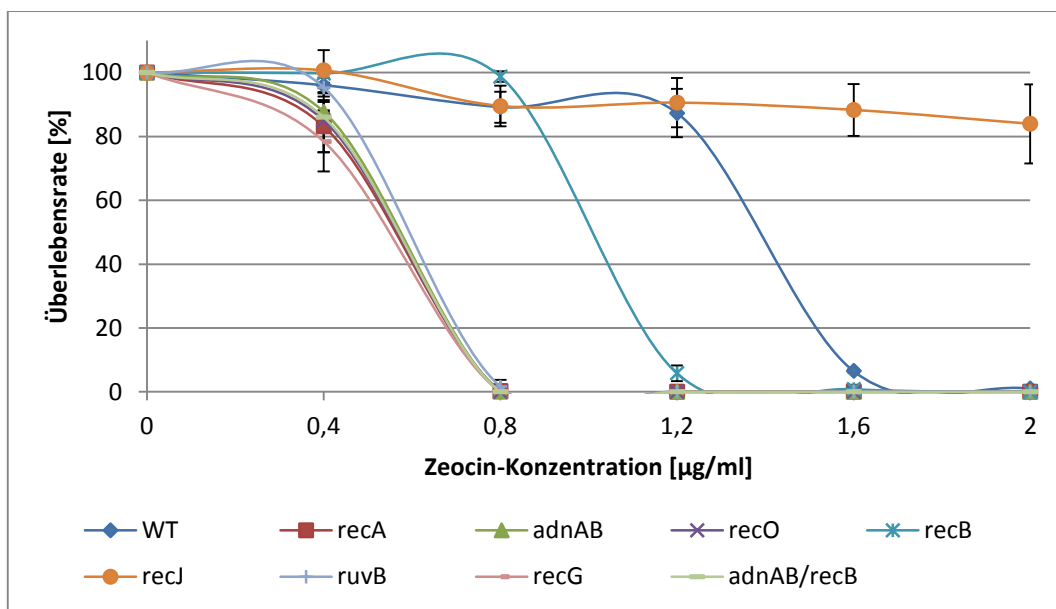


Abbildung 36: Überlebensraten der Deletionsstämme der RR und des Referenzstammes *C.*

***glutamicum* ATCC 13032 nach der Behandlung mit Zeocin**

Die Mittelwerte der Ergebnisse in Prozent sind aufgetragen. Zu sehen sind die Werte für den Wildtyp ATCC 13032 und die Mutanten FD7 ($\Delta recA$), FD16 ($\Delta adnAB$), FD17 ($\Delta recO$), FD46 ($\Delta recB$), FD20 ($\Delta recJ$), FD21 ($\Delta ruvB$), FD22 ($\Delta recG$) und die Doppelmutante FD47 ($\Delta recB/adnAB$).

Die Anwesenheit von Zeocin führte zu einer raschen Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit, die sich bei den in der RR betroffenen Mutanten noch deutlich stärker auswirkte (außer der $\Delta recJ$ -Mutante) als beim Wildtyp. Während die durchschnittlichen Überlebensraten des Ausgangsstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 bis zu einer Zeocin-Konzentration von 1,2

$\mu\text{g/ml}$ insgesamt nur um etwa 12 Prozentpunkte abnahmen, waren die Deletionsmutanten ΔrecA , ΔadnAB , ΔrecO , ΔruvB , ΔrecG sowie die Doppelmutante $\Delta\text{adnAB/recB}$ bei dieser Antibiotika-Dosis nicht mehr vermehrungsfähig. Die Behandlung mit $0,4 \mu\text{g/ml}$ Zeocin brachte bereits nur noch 80 bis 85 % heranwachsende Kolonien hervor. Die Werte der Deletionsmutante ohne *recB* waren bis zu einer Zeocin-Konzentration von $0,8 \mu\text{g/ml}$ stabil, fielen bei einer Zeocin-Konzentration von $1,2 \mu\text{g/ml}$ drastisch auf knapp 5 % ab und konnten keine weitere Erhöhung der Mutagen-Dosis tolerieren. Ein ganz anderes Bild als die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigte die *recJ*-Mutante. Die Deletion dieses Gens bewirkte eine deutliche Verbesserung der Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Referenzstamm. Selbst die eingesetzte Maximal-Dosis von $2 \mu\text{g/ml}$ des Mutagens wurde im Durchschnitt noch von etwa 84 % der Zellen toleriert.

3.6.3 Mitomycin C-Mutagenese

Die *C. glutamicum*-Stämme mit Mutationen in den Genen der RR wurden mit MMC versetzt und deren Überlebensraten berechnet. Das folgende Diagramm (Abbildung 37) zeigt die durchschnittlichen Werte.

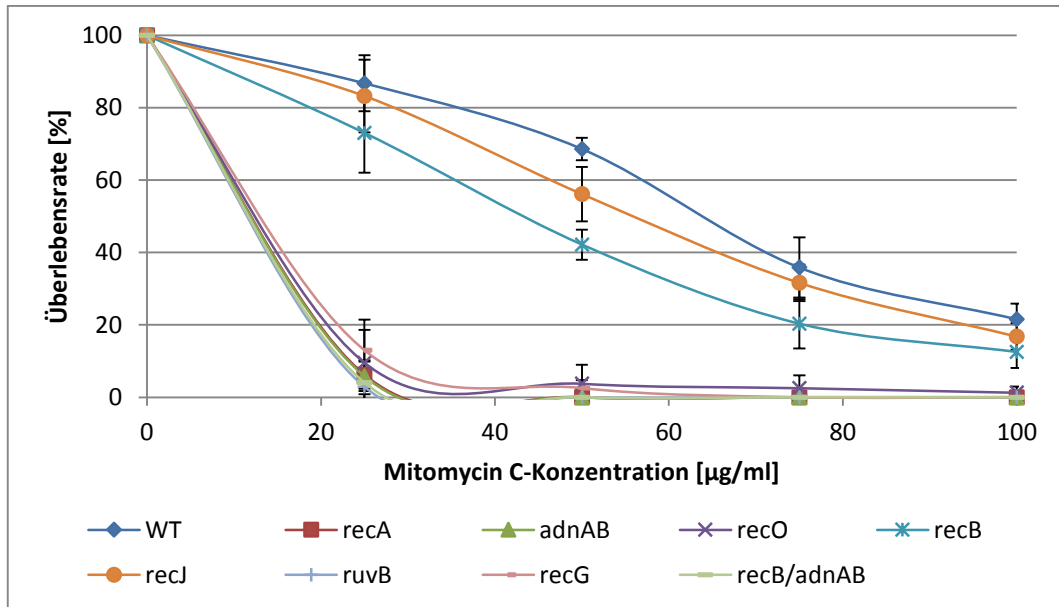


Abbildung 37: Überlebensraten der Deletionsmutanten aus der RR und des Wildtyps von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach der Mutagenese mit MMC

Die berechneten Überlebensraten im Vergleich zur unbehandelten Probe sind in Prozent angegeben und gegen die zunehmende MMC-Konzentration aufgetragen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es zwei Gruppen gibt, die sich jeweils ähnlich verhielten. Die erste Gruppe ($\Delta recA$, $\Delta adnAB$, $\Delta recO$, $\Delta ruvB$, $\Delta recG$ und die Doppelmutante $\Delta recB/adnAB$) war hochsensitiv und konnte bei einer MMC-Konzentration von 25 µg/ml schon fast keine Kolonien mehr bilden. Die andere Gruppe, nämlich die Mutanten $\Delta recB$ und $\Delta recJ$ verhielten sich ähnlich dem WT und zeigten eine deutlich geringere Sensitivität. Bei der Zugabe der Maximal-Dosis von 100 µg/ml MMC überlebten noch 20 % des WTs und der $\Delta recJ$ Mutante, ebenso etwa 15 % der $\Delta recB$ Mutante.

3.6.4 MNNG-Mutagenese

Ob die Mutationen in den Genen der RR zu einer Änderung der Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* nach der Behandlung mit MNNG führt, wurde im Folgenden untersucht. Da sich gezeigt hatte, dass die bisher geringste eingesetzte MNNG-Konzentration von 0,4 µg/ml schon zu einer drastisch verringerten Überlebensfähigkeit der Mutanten führte, wurden die MNNG-Mengen für die Mutagenese der Deletionsstäme aus der RR geringer gewählt. Es wurden

hier 0,2 bis 0,8 µg/ml des Mutagens eingesetzt. In Abbildung 38 sind die ermittelten Überlebensraten nach der Behandlung mit MNNG zusammengefasst.

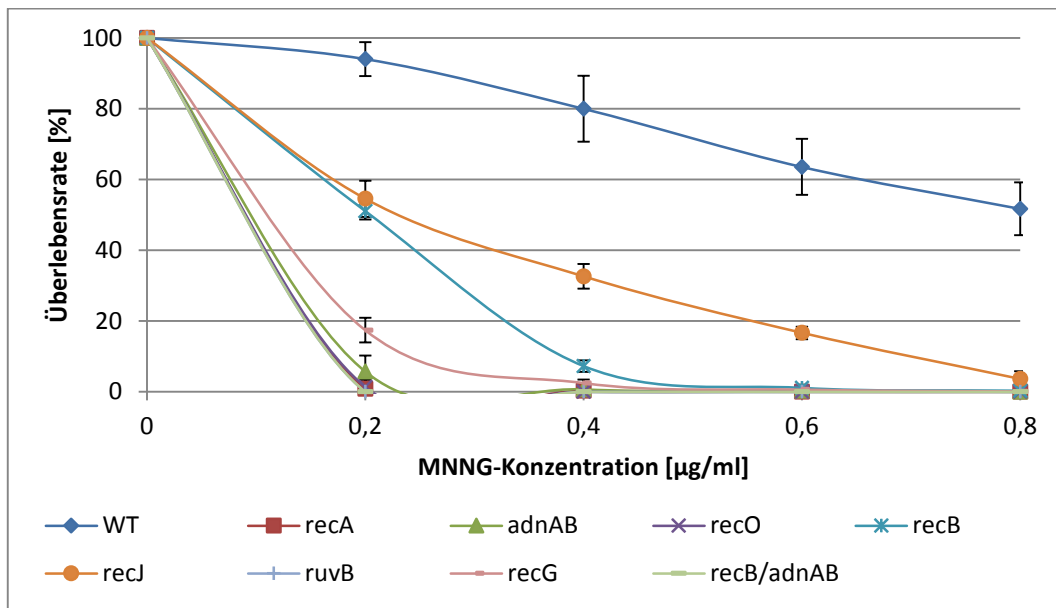


Abbildung 38: Überlebensraten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und den Deletionsstämmen der RR nach der Mutagenese mit MNNG

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen wurden die Überlebensraten der einzelnen Stämme in Prozent ermittelt und gegen die steigende MNNG-Dosis aufgetragen.

Im Diagramm (Abbildung 38) ist zu sehen, dass bereits eine MNNG-Konzentration von 0,2 µg/ml dazu führte, dass die Überlebensfähigkeit der Mutanten FD7 ($\Delta recA$), FD16 ($\Delta adnAB$), FD17 ($\Delta recO$), FD21 ($\Delta ruvB$) und FD47 ($\Delta recB/adnAB$) deutlich reduziert wurde. Bei der nächsthöheren Dosis von 0,4 µg/ml des Mutagens MNNG brachten auch die Mutanten FD46 ($\Delta recB$) und FD22 ($\Delta recG$) ebenfalls kaum noch heranwachsende Kolonien hervor. Während der Referenzstamm nach der MNNG-Zugabe von 0,8 µg/ml noch eine Überlebensfähigkeit von über 50 % aufwies, zeigte sich bei dieser Mutagen-Dosis, dass die Mutante ohne *recJ* kaum noch überlebensfähig war.

3.7 Charakterisierung der Aktivität von RecJ und RecB aus *C. glutamicum*

Zur Überprüfung der Funktion von RecJ und RecB wurden diese Gene zunächst in geeignete Expressionsplasmide integriert. Hierzu wurden die Plasmide pJOE6089.4 und pJOE6093.7

(Altenbuchner, nicht veröffentlicht) verwendet. Nach der Amplifikation der entsprechenden Gene über PCR mit der Q5-Polymerase wurden die erhaltenen Fragmente sowie die Zielplasmide mit den ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut. Im Folgenden wird die Entstehung der einzelnen Konstrukte genauer beschrieben.

3.7.1 Heterologe Expression von *recJ*

Zur Produktion und anschließenden Affinitätsaufreinigung von RecJ wurde die Fusion an einen *Strep-Tag* ausgewählt. Hierzu wurde das Plasmid pJOE6089.4 eingesetzt. Der *Strep-Tag* wurde in diesem Fall an das C-terminale Ende des Proteins fusioniert. Die Konstruktion des Expressionsplasmids erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI*. Es wurde dabei das *NEBuilder*[®]-System von NEB (New England Biolabs) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer S10572 und S10573 sind in Tabelle 9 aufgeführt. Nach der Konstruktion des Expressionsplasmids pFD40 wurde dieses über TSS-Transformation in den Stamm SoluBL21TM (Genlantis, USA) eingebracht. Die Induktion erfolgte mit 0,2% Rhamnose. Im Anschluss an die Genexpression wurden die Zellen am Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass die Löslichkeit des Fusionsproteins RecJ-*Strep* nicht gegeben war. Das Protein war ausschließlich in der unlöslichen Zell-Fraktion zu finden. Aus diesem Grund wurde parallel zum Expressionsplasmid pFD40 ein weiteres Plasmid zur Unterstützung der korrekten Faltung des Proteins in den Stamm eingebracht. Es handelte sich um das Plasmid pKJE7 (TaKaRa BIO INC.), welches die Gene *dnaK*, *dnaJ* und *grpE* trägt, deren Expression unter Kontrolle eines Arabinose-Promotors steht. Die Genexpression des neuen Stammes FD43 wurde mittels 0,2% Rhamnose und 0,05% Arabinose induziert. Nach der Aufreinigung des Rohextraktes über die *Strep-Tactin*[®]-Säule wurden die einzelnen Fraktionen auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung des Rohextraktes zu sehen.

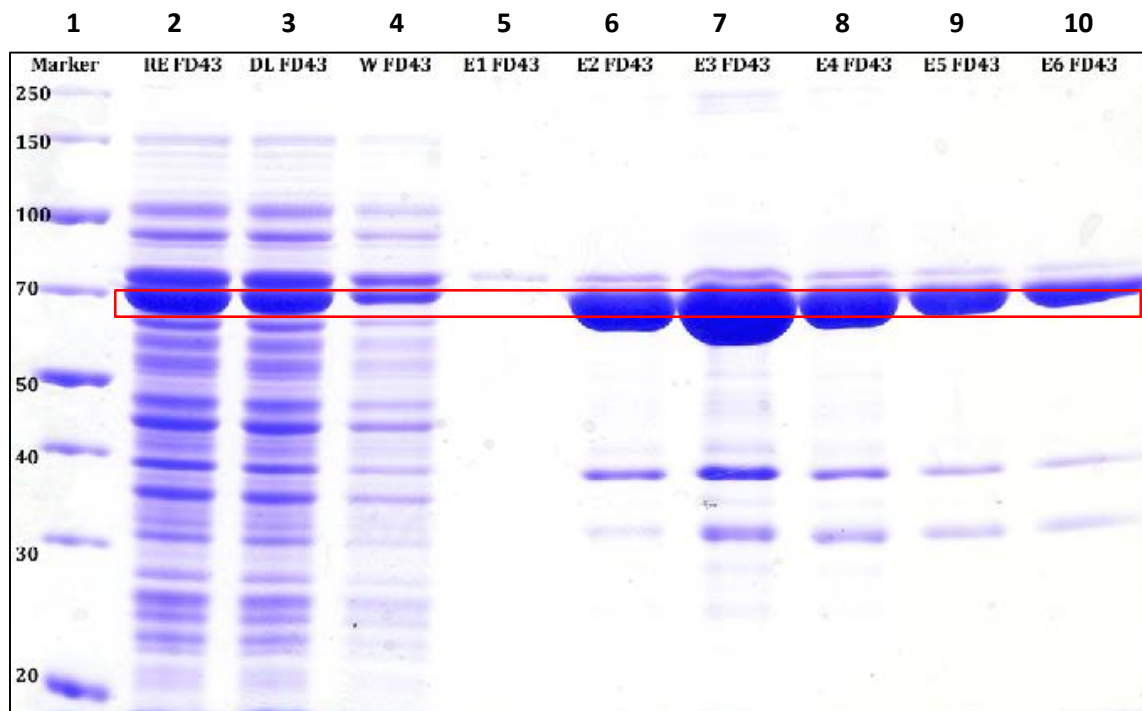


Abbildung 39: Elektrophoretische Auftrennung von RecJ nach der Strep-Tag-Aufreinigung

Nach 1-stündiger SDS-PAGE bei 20 V/cm und anschließender Coomassie-Färbung konnte die gesuchte Protein-Bande in den Eluaten 2 bis 6 gefunden werden. Spur 1: PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific [kDa], Spur 2: Rohextrakt (RE), Spur 3: Durchlauf (DL), Spur 4: Waschfraktionen (W), Spur 5 - 10: Eluat 1 (E1) - Eluat 6 (E6).

Die SDS-PAGE nach Aufreinigung des Rohextraktes von FD43 durch Affinitätschromatographie zeigte bei ca. 69 kDa deutliche Proteinbanden. RecJ hat eine Größe von 67,62 kDa. Da es gemeinsam mit dem Strep-Tag exprimiert wurde und dieser eine Größe von 1,06 kDa aufweist, sollte das gesuchte Protein ein Molekulargewicht von 68,7 kDa aufweisen (rot markiert). Die Waschfraktion enthielt nur eine schwache Proteinbande von dieser Größe. Im Durchlauf, also die Fraktion von Proteinen, die nicht an die Säule gebunden wurden, war noch eine deutliche Proteinbande bei ca. 69 kDa zu sehen. Die einzelnen Elutionsschritte (Spur 5 - 10) zeigten, dass im dritten Elutionsschritt die Ausbeute an gesuchtem Protein am größten war. Im ersten Elutionsschritt (E1) konnte kein Protein gewonnen werden. Die zusätzlichen Banden bei 70 kDa und 40 kDa dürften von den parallel exprimierten Chaperonen DnaK und DnaJ (auf pKJE7 codiert) verursacht worden sein. Außerdem war in den Eluaten 2 bis 6 noch eine weitere

Bande bei etwa 32 kDa zu sehen. Die Intensität dieser Banden war im Vergleich zur gewünschten Proteinbande jedoch sehr gering.

3.7.2 Produktion von RecB

Zur Untersuchung der Aktivität von RecB wurde die codierende Sequenz dieses Proteins (*recB*) ebenfalls zunächst in den Vektor pJOE6089.4 integriert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide S10570 und S10571 können Tabelle 9 entnommen werden. Die Klonierung erfolgte über *Gibson Assembly*[®] (New England Biolabs) und den Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI*. Nach der Induktion mit Rhamnose zeigte die SDS-PAGE, dass das gewünschte Protein ausschließlich in der unlöslichen Fraktion zu finden war. Auch die Transformation von SoluBL21[™] (Genlantis, USA) mit diesem Plasmid und der gleichzeitige Einsatz der Chaperon-Plasmide pKJE7 bzw. pGro7 (TaKaRa BIO INC.) brachte kein lösliches RecB-Protein hervor. In einem weiteren Versuch wurde dann *recB* als Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) exprimiert. Hierzu wurde das Expressionsplasmid pJOE6093.7 (Altenbuchner, nicht veröffentlicht) verwendet. Nach dem Restriktionsverdau mittels *BamHI* und *HindIII* wurde *recB* integriert. Die Amplifikation von *recB* wurde mit den Oligonukleotiden S11179 und S11180 (Tabelle 9) durchgeführt. Mit dem erhaltenen Expressionsplasmid wurde *E. coli* JM109 transformiert. Die Expression des Fusionsgens *malE-recB* wurde mit 0,2% Rhamnose induziert. Nach dem Zellaufschluss mit dem Hochdruck-Homogenisator und anschließender Affinitätschromatographie wurde das gesuchte Protein über Amylose Resin aufgereinigt und die erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung ist in Abbildung 40 zu sehen.

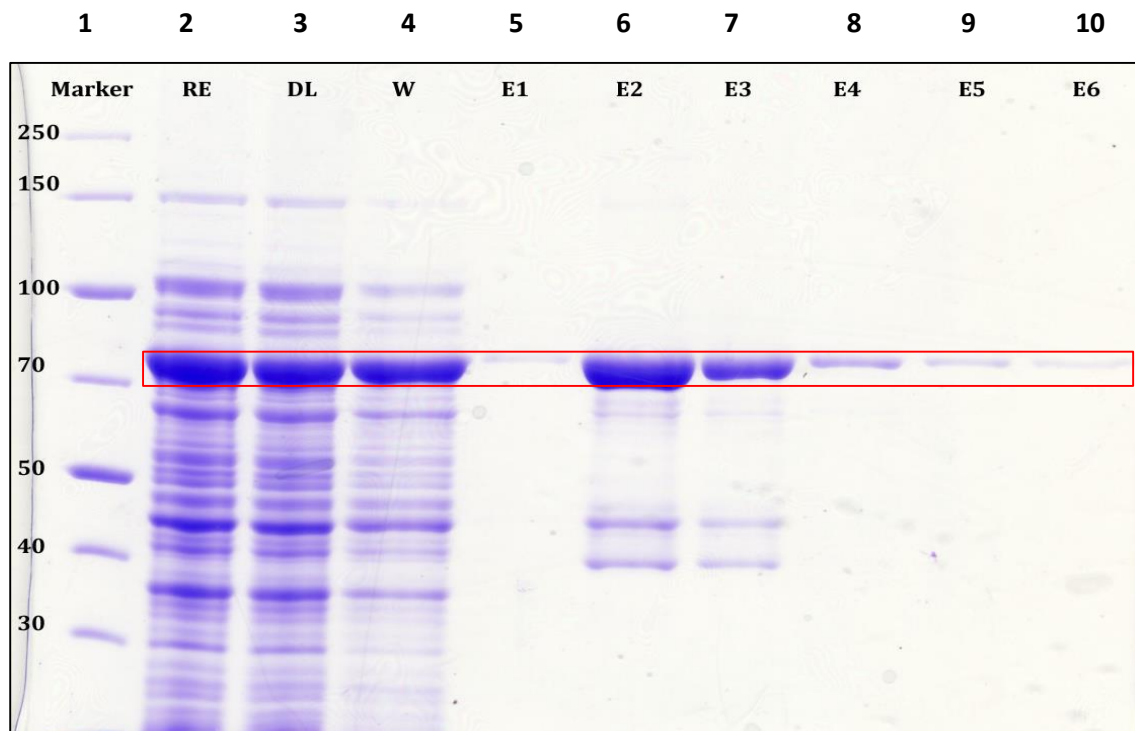


Abbildung 40: SDS-PAGE nach MalE-RecB-Aufreinigung aus FD48

Die SDS-PAGE fand für 1 h bei 20 V/cm statt. Spur 1: PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific [kDa], Spur 2: Rohextrakt (RE), Spur 3: Durchlauf (DL), Spur 4: Waschfraktionen (W), Spur 5 - 10: Eluat 1 (E1) - Eluat 6 (E6)

Abbildung 40 zeigt, dass in den Eluaten 2 und 3 eine deutliche Proteinbande einer Größe von ca. 74 kDa zu finden war (rote Markierung). Das Molekulargewicht von RecB beträgt 32,05 kDa, das des Maltose-bindenden Proteins 42 kDa. In den Eluaten 2 und 3 waren noch weitere schwache Banden zu sehen. Diese lagen bei 42 kDa bzw 40 kDa. Außerdem war hier zu sehen, dass auch in der Waschfraktion (W) eine deutliche Proteinbande bei 74 kDa zu finden war. Im Durchlauf (DL) und im Rohextrakt (RE) war dieses Signal ebenfalls gut sichtbar.

3.7.3 Untersuchung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB

Es ist bereits bekannt, dass RecJ eine Exonukleaseaktivität besitzt. In *E. coli* katalysiert RecJ die Entfernung von dNTPs aus doppelsträngiger DNA in 5'→3'-Richtung. Es sollte hierbei geklärt werden, ob RecJ aus *C. glutamicum* ebenfalls als Exonuklease agiert. Zunächst sollte der Abbau

verschiedener DNA-Fragmente qualitativ nachgewiesen werden. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 41 zu sehen.

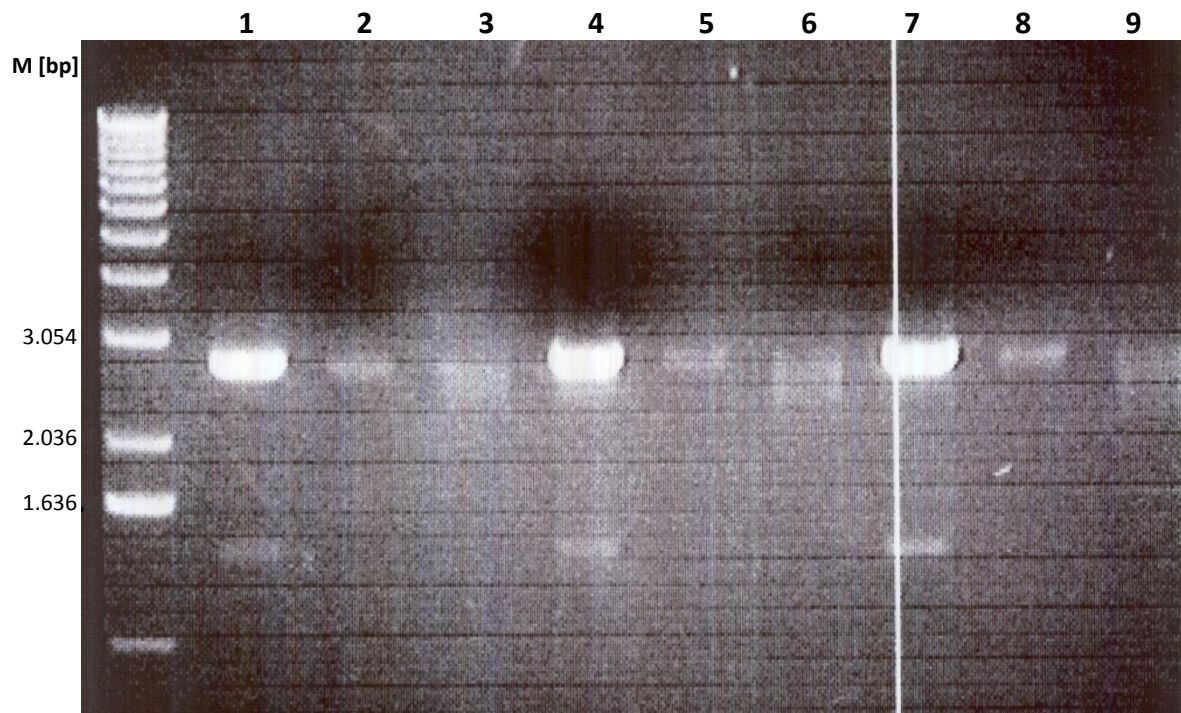


Abbildung 41: Exonukleaseaktivitätsnachweis RecJ

Agarosegel (1%ig) der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente nach Inkubation mit RecJ aus *C. glutamicum*. Die Ansätze 1 bis 9 wurden 3,5 h bei 30 °C inkubiert. Der Gellauf wurde für 1 h bei 8 V/cm durchgeführt. Es wurde der 1x NEBuffer™ 2 verwendet und der gesamte Ansatz (10 µl) auf das Gel aufgetragen.

M: 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), **1:** 30 ng pUC18 \times HindIII, **2:** 30 ng pUC18 \times HindIII + 1 µg RecJ, **3:** 30 ng pUC18 \times HindIII + 5 µg RecJ, **4:** 30 ng pUC18 \times SmaI, **5:** 30 ng pUC18 \times SmaI + 1 µg RecJ, **6:** 30 ng pUC18 \times SmaI + 5 µg RecJ, **7:** 30 ng pUC18 \times SphI, **8:** 30 ng pUC18 \times SphI + 1 µg RecJ, **9:** 30 ng pUC18 \times SphI + 5 µg RecJ.

In Abbildung 41 ist zu sehen, dass in den Spuren 1, 4 und 7 (linearisierter pUC18) eine deutliche Bande bei 2,7 kbp zu finden war (pUC18 hat eine Größe von 2.686 bp). In den Spuren 2, 3, 5, 6, 8 und 9 (linearisierter pUC18 + RecJ) waren diese DNA-Banden kaum noch zu erkennen.

Während nach Zugabe von 1 µg des Enzyms (Spur 2, 5 und 8) das Banden-Signal deutlich abgeschwächt war, führte die Zugabe von 5 µg des Enzyms in den Reaktionsansätzen zusätzlich zur Ausbildung eines Schmiers. Die Degradierung der DNA ist aber schon durch die Zugabe von nur 1 µg RecJ deutlich zu sehen. Weiterhin zeigte dieser Versuch, dass RecJ aus *C. glutamicum* unabhängig von der Art des Fragment-Endes die DNA abbaut. Sowohl pUC18 mit 5'-Überhang (linearisiert mit *HindIII*) oder 3'-Überhang (linearisiert mit *SphI*) als auch die *blunt end* pUC18-DNA (linearisiert mit *SmaI*) wurde in diesem Versuch degradiert. Zum Vergleich wurden die DNA-Fragmente auch ohne Enzym inkubiert und auf das Agarosegel aufgetragen. Um auszuschließen, dass die Degradation der DNA durch eine Kontamination des Rohextraktes mit Nukleasen aus *E. coli* verursacht wurde, wurde im Weiteren der Abbau unter Einsatz des Rohextraktes ohne RecJ untersucht (siehe Abbildung 44).

Vergleicht man weiterhin die Aktivität von RecJ aus *C. glutamicum* mit RecJ_f (Fusion mit MBP) aus *E. coli* (New England Biolabs), zeigte sich folgendes Ergebnis.

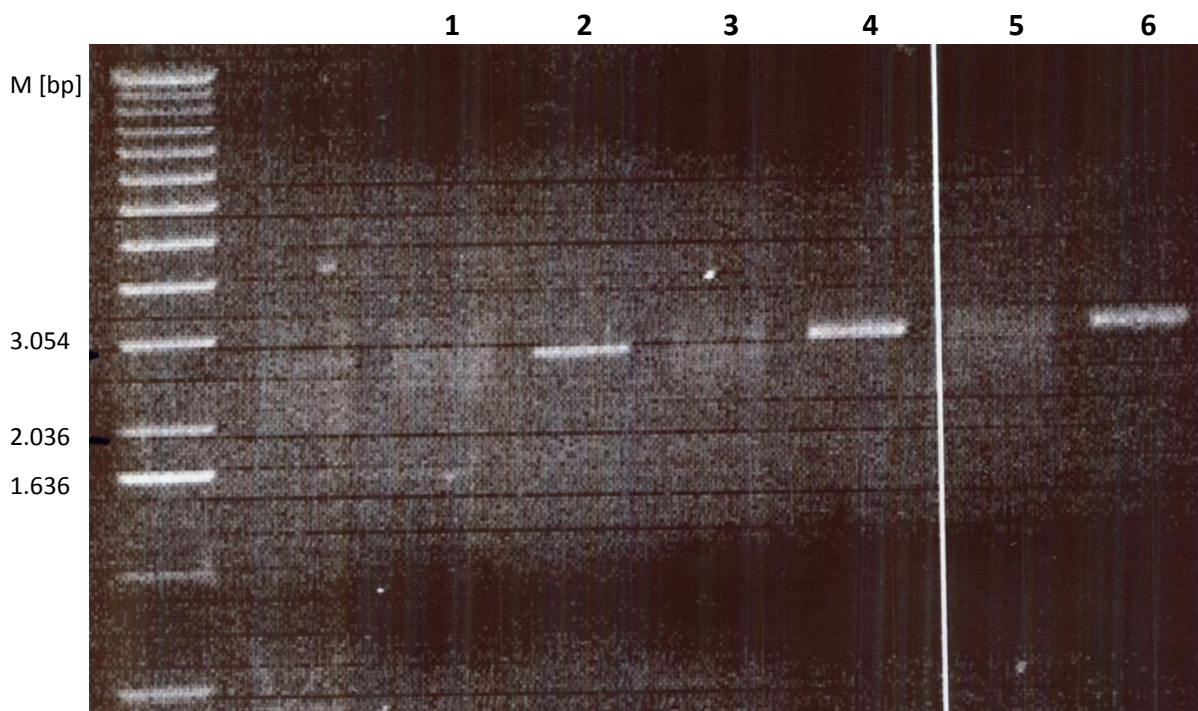


Abbildung 42: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ aus *C. glutamicum* und RecJ_f aus *E. coli*

Nach 4 h bei 37 °C wurden die Ansätze auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Es wurden pro 10 µl-Ansatz 100 ng der entsprechend verdauten DNA, 3 µg des

jeweiligen Proteins und 1x NEBuffer™ 2 eingesetzt. Der Gellauf fand für 50 min bei 8 V/cm statt. M: 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), **1:** pUC18 \times *Sma*I + RecJ, **2:** pUC18 \times *Sma*I + RecJ_f, **3:** pUC18 \times *Hind*III + RecJ, **4:** pUC18 \times *Hind*III + RecJ_f, **5:** pUC18 \times *Sph*I + RecJ, **6:** pUC18 \times *Sph*I + RecJ_f.

Auch hier wurde wieder ersichtlich, dass RecJ aus *C. glutamicum* die DNA abgebaut hatte. RecJ_f aus *E. coli* (NEB) hingegen, führte unter diesen Bedingungen nicht zur Degradierung der linearisierten pUC18-DNA. Die DNA-Banden waren in den Spuren 2, 4 und 6 etwa bei der Marker-Laufweite von 2,7 kbp zu sehen. In den Spuren 1, 3 und 5 war kaum noch DNA erkennbar.

Frühere Versuche hatten bereits gezeigt, dass RecJ aus *E. coli* doppelsträngige DNA ohne Überhang-Enden nicht degradiert und mindestens 5 Basen-Überhänge für den Abbau in 5' → 3'-Richtung benötigt (Lovett und Kolodner 1989). Aus diesem Grund wurden durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide DNA-Fragmente konstruiert, die jeweils einen 10 Basen-Überhang besitzen. Hierbei wurden die Oligonukleotide S11062, S11063, S11064 und S11065 (Tabelle 8) verwendet. Durch die Hybridisierung der verschiedenen Oligonukleotide wurden doppelsträngige DNA-Fragmente gebildet, die zum einen über glatte Enden (S11062 + S11063) und zum anderen über 10 Basen-Überhänge am 3'-Ende (S11062 + S11064) bzw. am 5'-Ende (S11062 + S11065) verfügten (Sequenzen siehe Tabelle 10). Diese etwa 70 bp großen Fragmente wurden dann als Substrat-DNA in den Nuklease-Assay eingesetzt. Neben RecJ wurde hier auch gleichzeitig eine mögliche Nukleaseaktivität von RecB untersucht. Nach 3-stündiger Inkubation bei 30 °C (RecJ und RecB aus *C. glutamicum*) bzw. 37 °C (RecJ_f aus *E. coli*) wurden die Ansätze dann auf ein natives Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen und die Degradierung der DNA durch Elektrophorese kontrolliert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der folgenden Abbildung zu sehen (Abbildung 43).

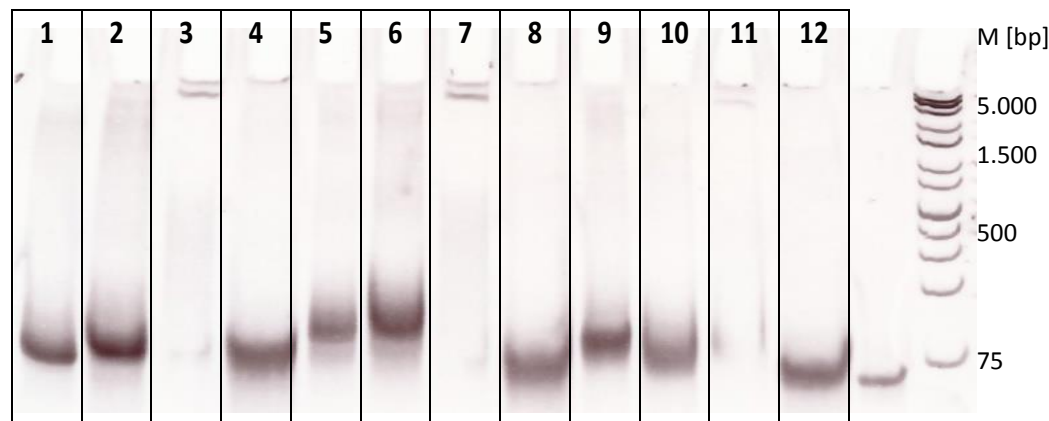


Abbildung 43: Natives Polyacrylamidgel zur Überprüfung der DNA-Degradierung durch

RecJ, RecJ_f und RecB

Das native PAA-Gel (15 %ig) zeigt das Ergebnis der Reaktion der verschiedenen DNA-Fragmente nach Inkubation mit RecJ, RecJ_f und RecB. Der Gellauf fand für 1 h bei 20 V/cm statt. Es wurden 500 ng DNA und 2,5 µg des jeweiligen Proteins pro Ansatz (10 µl) eingesetzt. Für den Abbau durch RecJ und RecJ_f wurde 1x NEBuffer™ 2, für den Abbau durch RecB wurde 1x Ligationspuffer (Roche) zu den Reaktionsansätzen hinzugefügt.

1: *blunt end*-DNA, **2:** *blunt end*-DNA + RecJ_f, **3:** *blunt end*-DNA + RecJ, **4:** *blunt end*-DNA + RecB, **5:** 3'-Überhang-DNA, **6:** 3'-Überhang-DNA + RecJ_f, **7:** 3'-Überhang-DNA + RecJ, **8:** 3'-Überhang-DNA + RecB, **9:** 5'-Überhang-DNA, **10:** 5'-Überhang-DNA + RecJ_f, **11:** 5'-Überhang-DNA + RecJ, **12:** 5'-Überhang-DNA + RecB, **M:** GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Zur Beurteilung der Änderung der Laufeigenschaften der DNA-Fragmente nach der Behandlung mit den verschiedenen Enzymen, wurden die jeweiligen DNA-Fragmente ohne Zugabe eines Proteins als Standard aufgetragen (Spur 1, 5 und 9). Die Abbildung 43 zeigt wieder, dass RecJ aus *C. glutamicum* die DNA nach 3 h vollständig abgebaut hatte, unabhängig davon ob es sich um glatte Enden, 3'-überhängende Enden oder 5'-überhängende Enden handelte (Spur 3, 7 und 11). Wurde RecJ_f zu den konstruierten dsDNA-Fragmenten gegeben, konnte keine Degradierung der *blunt-end*-DNA (Spur 2) und dem DNA Fragment mit 10 Basen-3'-überhängenden Enden (Spur 6) beobachtet werden. Im Fall der 5'-Überhang-DNA (Spur 10) war hingegen eine leichte Veränderung der Laufweite, im Vergleich zur unbehandelten DNA (Spur 9), zu erkennen. Zur Untersuchung der Nukleaseaktivität von RecB wurden, neben den

Ansätzen mit RecJ aus *C. glutamicum* und RecJ_f, hier auch die Ansätze mit RecB aus *C. glutamicum* aufgetragen (Spur 4, 8 und 12). Wurde DNA mit 3'-Überhang eingesetzt, so konnte beobachtet werden, dass die DNA etwas weiter im Gel gewandert war (Spur 8). Vergleicht man die Signale zwischen der 5'-Überhang-DNA ohne Protein (Spur 9) und mit RecB (Spur 12), so fällt auf, dass sich auch im letzteren Fall die Laufeigenschaften der DNA verändert hatte und eine Degradierung des DNA-Fragments erkennbar war.

Zur weiteren Charakterisierung von RecJ aus *C. glutamicum* sollte geklärt werden, ob evtl. weitere Bestandteile des Rohextraktes für den Abbau der DNA verantwortlich waren. Dazu wurde das Expressionsplasmid pJOE6089.4 (mit eGFP statt *recJ*) gemeinsam mit pKJE7 in den Stamm SoluBL21™ eingebracht. Der erhaltene Stamm FD49 wurde wie zur Überexpression von RecJ in FD43 behandelt. Auch der Rohextrakt wurde in gleicher Weise aufgereinigt und das erhaltene Eluat für die Überprüfung der Nukleaseaktivität eingesetzt. In diesem Fall wurden 400 ng pUC18 (linearisiert mit *HindIII* → 5'-Überhang) je Ansatz als Substrat verwendet. Außerdem sollte durch dieses Experiment gleichzeitig eine quantitative Bestimmung der Nukleaseaktivität erfolgen. Die Degradierung der DNA mit steigender Inkubationszeit wurde durch die elektrophoretische Auftrennung auf dem Agarosegel (1%) aufgezeigt (Abbildung 44).

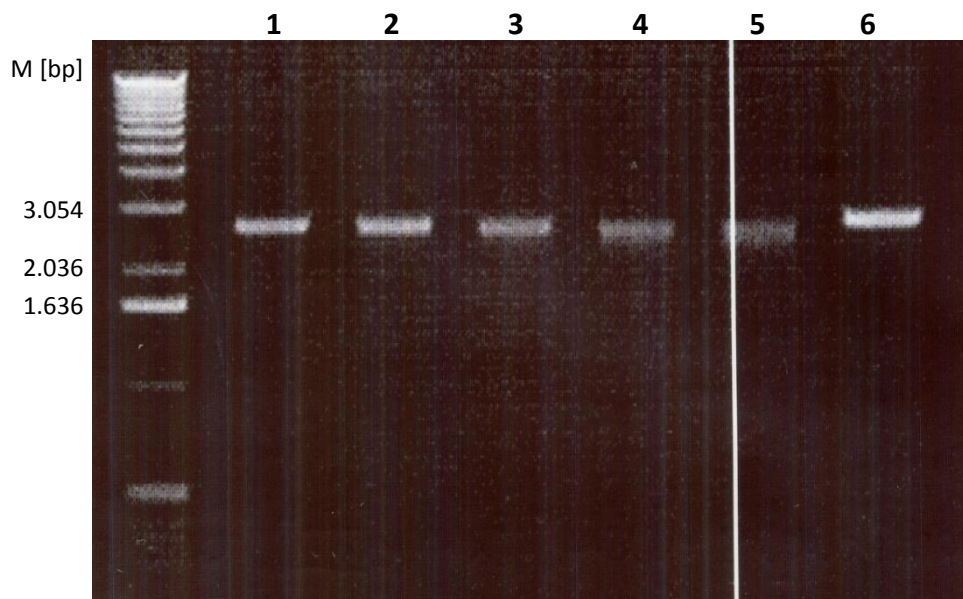


Abbildung 44: Degradierung der DNA durch RecJ aus *C. glutamicum* mit zunehmender Inkubationszeit

Es wurden 400 ng DNA, 2,5 µg Protein und 1x NEBuffer™ 2 eingesetzt. Nach 0, 30, 60, 90 und 120 min bei 30 °C wurden die Ansätze auf Eis gehalten um die Reaktion abzustoppen. Die Proben (gesamter Ansatz, 10 µl) wurden dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und der Abbau der DNA mit steigender Inkubationszeit untersucht. Der Gellauf fand für 1 h bei 6 V/cm statt. In Spur 6 wurde zusätzlich ein Reaktionsansatz ohne RecJ aufgetragen. **M**: 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen), **1**: pUC18 \otimes HindIII + RecJ, 0 min, **2**: pUC18 \otimes HindIII + RecJ, 30 min, **3**: pUC18 \otimes HindIII + RecJ, 60 min, **4**: pUC18 \otimes HindIII + RecJ, 90 min, **5**: pUC18 \otimes HindIII + RecJ, 120 min, **6**: pUC18 \otimes HindIII + Rohextrakt ohne RecJ, 120 min.

In Abbildung 44 ist deutlich zu sehen, dass die Degradierung mit steigender Inkubationszeit zunahm. Die Signalintensität der DNA-Bande wurde dabei mit zunehmender Inkubationszeit immer schwächer. Außerdem änderte sich auch die Laufweite der DNA. So hatte die DNA in Spur 5 die größte Laufweite zurückgelegt. Im Vergleich zu Spur 6 wurde das besonders deutlich. Hier wurde der Rohextrakt ohne RecJ aufgetragen. Für eine quantitative Bestimmung der Nuklease-Aktivität war diese Methode allerdings zu ungenau.

Wie in den Vorversuchen bereits gezeigt wurde, führte RecB offensichtlich zu einer Degradierung doppelsträngiger DNA mit überhängenden Enden (Abbildung 43). Ob es sich hierbei tatsächlich um eine reine Helikaseaktivität handelte oder ob die veränderte Laufeigenschaft der DNA auch durch eine Nukleaseaktivität verursacht wurde, musste weiter überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Y-förmige Fluoreszenz-markierte DNA-Fragmente eingesetzt und deren Abbau auf einem Polyacrylamidgel verfolgt. Zur Herstellung dieser Fragmente wurde ein FITC-markiertes Oligonukleotid (S11178*5) mit jeweils einem weiteren Oligonukleotid (S11177 bzw. S11215) hybridisiert. In der folgenden Abbildung (Abbildung 45) sind die konstruierten DNA-Fragmente schematisch dargestellt.

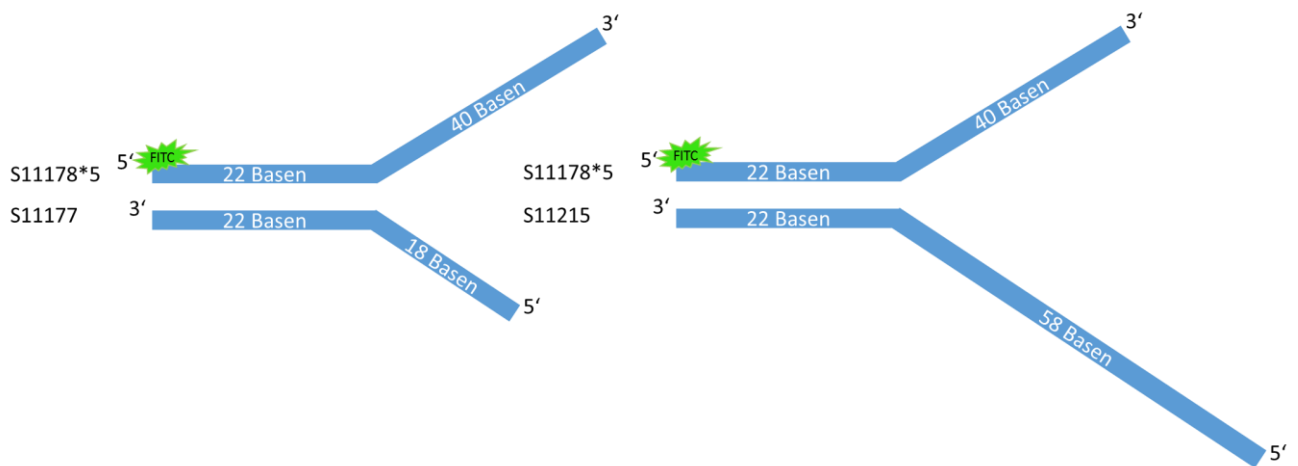


Abbildung 45: Konstruierte Y-förmige Duplex-DNA zum Nachweis der Nuklease- bzw. Helikaseaktivität von RecB

Das FITC-markierte Oligonukleotid S11178*5 wurde mit dem Oligonukleotid S11177 bzw. S11215 hybridisiert (Sequenzen siehe Tabelle 10). Dabei entstanden zwei verschiedene Y-förmige DNA-Fragmente. Anschließend an den doppelsträngigen Bereich (22 bp lang) zweigten sich die Fragmente in einzelsträngige Enden auf. Das Produkt aus S11178*5 und S11177 verfügte über ein längeres 3'-Ende. Das Produkt aus der Hybridisierung von S11178*5 und S11215 besaß ein verlängertes 5'-Ende. Die FITC-Markierung am 5'-Ende von S11178*5 wurde von MWG Eurofins durchgeführt.

Diese DNA-Fragmente dienten dann als Substrat für RecB. Dieser Versuch diente außerdem zur Überprüfung der vermuteten ATP-abhängigkeit des Enzyms. Hierzu wurden Ansätze

hergestellt, die anstelle des verwendeten ATP-haltigen Ligationspuffers mit dem NEBuffer™ 2 versetzt wurden. Nach erfolgter Inkubation wurden die einzelnen Ansätze auf ein 9%iges PAA-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Gellauf wurde im Dunkeln durchgeführt um den Zerfall des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Phosphoimagers (Molecular Dynamics) bei 495 nm/519 nm detektiert. In Abbildung 46 ist das Ergebnis dieser Untersuchung zu sehen.

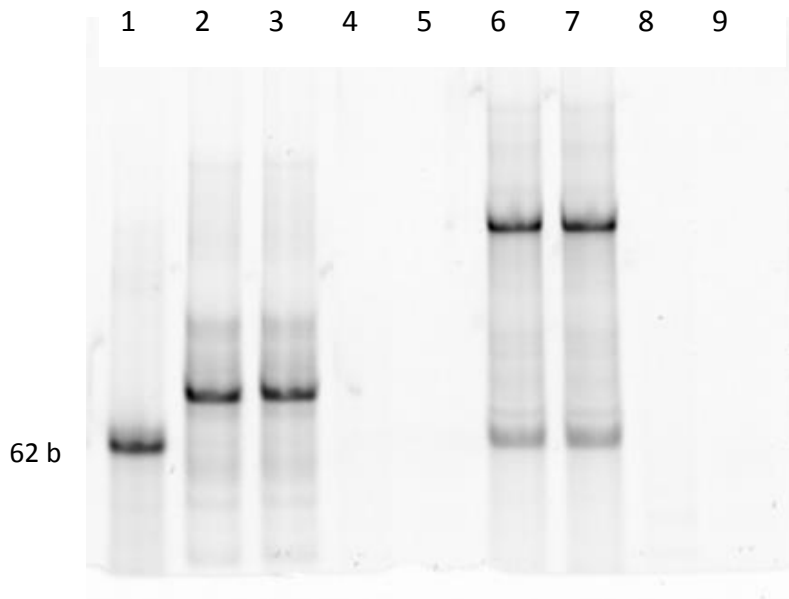


Abbildung 46: Nachweis der Nukleaseaktivität und ATP-Abhängigkeit von RecB mittels FITC-markierter Y-Duplex-DNA

Zur Untersuchung der Aktivität von RecB wurden 400 ng DNA und 2,5 µg RecB eingesetzt. Als Puffer diente der ATP-haltige 1 x Ligationspuffer von Roche (Spuren 4, 5, 8 und 9) bzw. der NEBuffer™ 2 (Spur 3 und 7). Nach 1- bzw. 2,5-stündiger Inkubation (30 °C) der DNA-Fragmente mit bzw. ohne RecB aus *C. glutamicum* wurden die Ansätze auf ein 9 %iges PAA-Gel aufgetragen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (1 h, 20 V/cm). **1:** S11178*5, **2:** S11178*5/S11177 (längeres 3'-Ende), Inkubation für 1 h, **3:** S11178*5/S11177 (längeres 3'-Ende) + RecB, ohne ATP, Inkubation für 2,5 h, **4:** S11178*5/S11177 (längeres 3'-Ende) + RecB, Inkubation für 1 h, **5:** S11178*5/S11177 (längeres 3'-Ende) + RecB, Inkubation für 2,5 h, **6:** S11178*5/S11215 (längeres 5'-Ende), Inkubation für 1 h, **7:** S11178*5/S11215 (längeres 5'-Ende) + RecB, ohne ATP, Inkubation für 2,5 h, **8:** S11178*5/S11215 (längeres 5'-Ende) + RecB, Inkubation für 1 h, **9:** S11178*5/S11215 (längeres 5'-Ende) + RecB, Inkubation für 2,5 h.

Die Aufnahme des PAA-Gels (Abbildung 46) zeigt, dass die Zugabe von RecB dazu führte, dass keine DNA mehr detektiert werden konnte. Schon nach 1 h wurden beide Y-Duplex-DNA-Fragmente, sowohl mit 3'- (Spur 4) als auch mit 5'-Überhang (Spur 8), vollständig abgebaut. In Spur 1 wurde lediglich das Oligonukleotid S11178*5 aufgetragen. Hier war eine deutliche Bande sichtbar. Durch die Hybridisierung mit dem 2. Oligonukleotid kam es zu einer Verzögerung der Wanderung im Gel. Entsprechend ihrer Laufeigenschaften, waren die DNA-Signale der Y-förmigen DNA-Fragmente ohne RecB deutlich zu erkennen. Diese veränderte sich durch die Inkubation mit RecB unter Verwendung des NEBuffer™ 2 (ohne ATP) nicht.

Im weiteren Verlauf wurden noch zusätzliche FITC-markierte DNA-Fragmente hergestellt. Diese sollten Hinweise auf die Richtung der Exonukleaseaktivität der untersuchten Proteine geben. Hierbei wurden wieder FITC-markierte Oligonukleotide hybridisiert. Die Fluoreszenzmarkierung sollte zum Blockieren des jeweiligen Endes dienen. In Abbildung 47 sind die erhaltenen Konstrukte schematisch dargestellt.

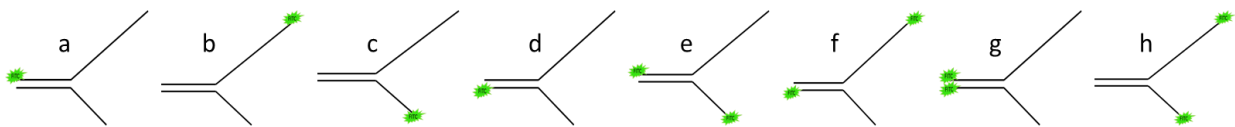


Abbildung 47: Y-förmige DNA-Konstrukte zur Überprüfung der Nukleaseaktivität

Zur Herstellung der DNA-Substrate wurden verschiedene Oligonukleotide miteinander hybridisiert. Die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgeführt. **a:** S11178*5/S11177, **b:** S11178*3/S11177, **c:** S11178/S11177*5, **d:** S11178/S11177*3, **e:** S11178*5/S11177*5, **f:** S11178*3/S11177*3, **g:** S11178*5/S11177*3, **h:** S11178*3/S11178*5.

Durch die verschiedenen Kombinationen der einzelnen Oligonukleotide konnten unterschiedliche Konstrukte gebildet werden. So wurde gewährleistet, dass die FITC-Markierung entweder an jeweils einem 3'- oder 5'-Ende, an beiden 3'- bzw. 5'-Enden, am doppelsträngigen Ende oder am einzelsträngigen Ende saß. Nach erfolgter Inkubation der Y-

Duplex-DNA mit RecJ bzw. RecB wurden die Ansätze auf ein 15%iges natives PAA-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

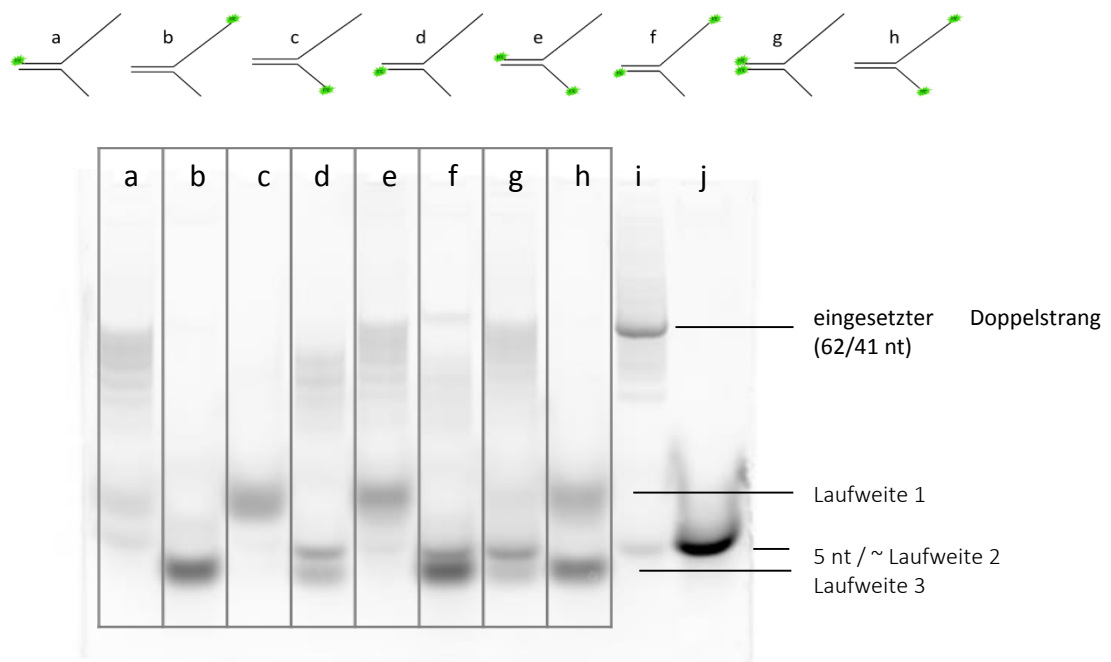


Abbildung 48: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ aus *C. glutamicum*

Nach der Inkubation der verschiedenen DNA-Konstrukte (400 ng) mit RecJ (2,5 μ g) und 1x NEBuffer™ 2 wurden die einzelnen Ansätze auf ein 15 %iges natives PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (1 h, 20 V/cm). Anschließend wurde die FITC-markierte DNA mittels Phosphoimager detektiert. **a:** S11178*5/S11177 + RecJ, **b:** S11178*3/S11177 + RecJ, **c:** S11178/S11177*5 + RecJ, **d:** S11178/S11177*3 + RecJ, **e:** S11178*5/S11177*5 + RecJ, **f:** S11178*3/S11177*3 + RecJ, **g:** S11178*5/S11177*3 + RecJ, **h:** S11178*3/S11178*5 + RecJ, **i:** S11178*5/S11177*5, **j:** FITC-markierter Einzelstrang (5 Nukleotide lang).

Wie in Abbildung 48 zu sehen, katalysierte RecJ den Abbau der verschiedenen DNA-Substrate. In den Spuren a bis h waren jeweils deutlich unterhalb der 62/41 nt-Marke (siehe Spur i) Banden sichtbar. Trug dabei das einzelsträngige 5'-Ende (Spuren c, e und h) die FITC-Markierung, waren diese Banden etwas weiter oben (Laufweite 1) zu finden. War das einzelsträngige 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Spuren b, f und h), sind die

Proben etwas weiter im Gel gewandert (Laufweite 3). Auch in den Spuren d und g war diese Bande zu finden. Allerdings war das Signal hier nur sehr schwach. Außerdem wurden, in einigen Fällen, etwas oberhalb von Laufweite 3 weitere Banden sichtbar (Spur d, f und g). Diese lagen im Bereich des 5 nt großen Längenstandards, der in Spur j aufgetragen wurde (Laufweite 2). Hier war das 3'-Ende im ds-Bereich mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In Spur a wurden zwei sehr schwache DNA-Signale sichtbar. Eines bei Laufweite 1 und ein weiteres bei Laufweite 2. Zur Kontrolle wurde eines der Konstrukte ohne die Zugabe von RecJ mit aufgetragen (Spur i). Somit konnte die eigentliche Laufweite der eingesetzten DNA gezeigt werden.

Zur weiteren Charakterisierung von RecB wurde dieses Experiment unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde statt dem NEBuffer™ 2 der ATP-haltige Ligasepuffer von Roche eingesetzt.

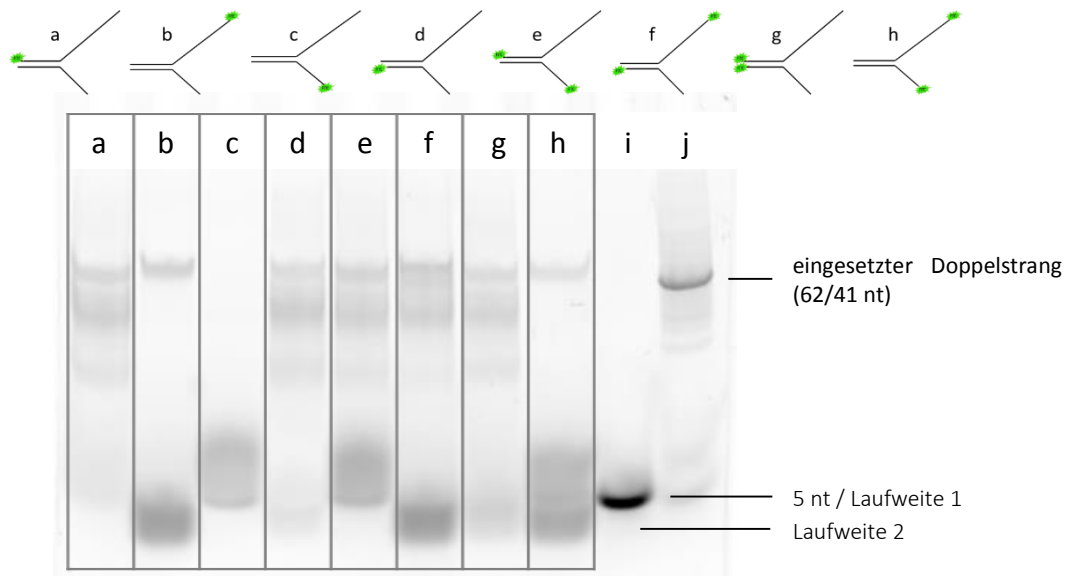


Abbildung 49: Substratspezifische Nukleaseaktivität von RecB aus *C. glutamicum*

Nach der Inkubation der verschiedenen DNA-Konstrukte mit RecB wurden die einzelnen Ansätze auf ein 15 %iges natives PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die FITC-markierte DNA mittels Phosphoimager detektiert. Auch hier wurden 400 ng DNA und 2,5 µg des Proteins (RecB) eingesetzt. Für die Reaktion wurde 1x Ligationspuffer von Roche verwendet. **a:** S11178*5/S11177 + RecB, **b:** S11178*3/S11177 + RecB, **c:** S11178/S11177*5 + RecB, **d:** S11178/S11177*3 + RecB, **e:** S11178*5/S11177*5 + RecB, **f:** S11178*3/S11177*3 + RecB, **g:** S11178*5/S11177*3 + RecB, **h:** S11178*3/S11178*5 + RecB, **i:** S11178*5/S11177*5, **j:** FITC-markierter Einzelstrang (5 Nukleotide lang).

Auch RecB führte, ähnlich wie RecJ, zur Degradierung der eingesetzten Y-Duplex-DNA. Allerdings waren vermehrt DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen im oberen Bereich des Gels zu finden. Im unteren Bereich des Gels wurden 2 verschiedene Banden sichtbar. Im Fall der eingesetzten DNA „b“, „f“ und „h“ war in Laufweite 2 jeweils eine Bande zu sehen. Hier waren wieder die 3'-Enden im einzelsträngigen Bereich der Konstrukte mit dem FITC-Farbstoff besetzt. Etwas weiter oben, bei etwa 5 nt (Laufweite 1) wurden Banden sichtbar, wenn das 5'-Ende des einzelsträngigen Bereichs markiert war (Spur c, e und h). In den Spuren a, d und g waren kaum noch Signalbanden zu sehen. Hierbei befand sich die FITC-Markierung ausschließlich am doppelsträngigen Ende der Substrat-DNA. Insgesamt waren die

Signalbanden nach der Inkubation mit RecB weniger scharf abgegrenzt als nach dem selben Experiment mit RecJ (Abbildung 48).

Im weiteren Verlauf sollte zusätzlich geklärt werden, ob die Enzymaktivität von RecJ und RecB aus *C. glutamicum* die Y-Struktur erfordert und ob evtl. auch einzelsträngige DNA abgebaut wird. Dazu wurden weitere dsDNA-Fragmente über Hybridisierung zweier Oligonukleotide hergestellt. Hierbei wurden wieder Kombinationen aus verschiedenen FITC-markierten Oligonukleotide eingesetzt, so dass entweder ein 5'- bzw. 3'-Ende oder beide 5'- bzw. 3'-Enden die FITC-Markierung trugen (siehe Abbildung 50). Für die Untersuchung der Degradation einzelsträngiger DNA wurden ebenfalls FITC-markierte Oligonukleotide (S11177*5 → FITC-Markierung am 5'-Ende, S11177*3 → FITC-Markierung am 3'-Ende) direkt in den Exonuklease-Assay eingesetzt.



Abbildung 50: DNA-Konstrukte zur Charakterisierung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB

a: S11177*5/S11796, **b:** S11177*3/S11796, **c:** S11177*5/S11796*5, **d:** S11177*3/S11796*3, **e:** S11177*5, **f:** S11178*3.

Nach Inkubation für 30 min bei 30°C wurden die Ansätze auf ein 15 %iges natives PAA-Gel aufgetragen und die FITC-markierte DNA mittels Phosphoimager detektiert. Die Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

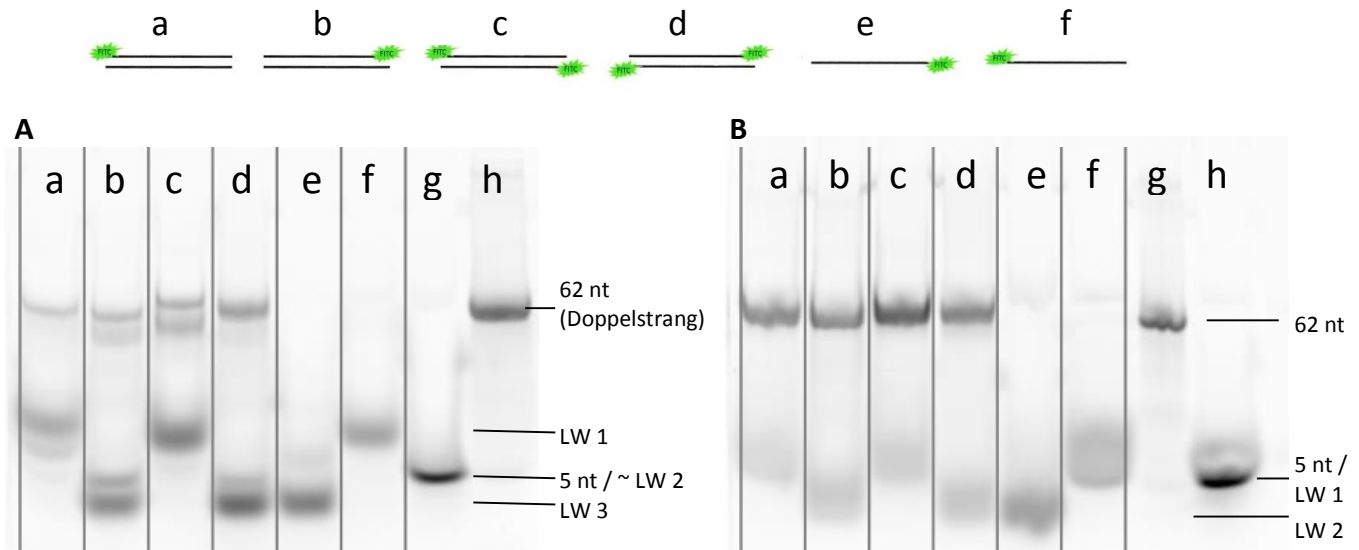


Abbildung 51: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB aus *C. glutamicum*

In diesem Versuch wurde dsDNA ohne ss-Bereiche (also keine Y-Struktur) und einzelsträngige DNA eingesetzt. Dazu wurden 400 ng der DNA und 2,5 µg des Proteins mit NEBuffer™ 2 (RecJ) bzw. Ligations-Puffer (RecB) inkubiert. Nach 1 h bei 30°C im Dunkeln wurden die Ansätze durch PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Gellauf für das 15 %ige native PAA-Gel fand für 50 min bei 20 V/cm statt. Die Detektion der Fluoreszenz-markierten DNA erfolgte über den Phosphoimager.

A: **a:** S11177*5/S11796 + RecJ, **b:** S11177*3/S11796 + RecJ, **c:** S11177*5/S11796*5 + RecJ, **d:** S11177*3/S11796*3 + RecJ, **e:** S11177*5 + RecJ, **f:** S11178*3 + RecJ, **g:** S12013 (FITC-markiertes Oligonukleotid, 5 nt) **h:** S11177*5/S11796.

B: **a:** S11177*5/S11796 + RecB, **b:** S11177*3/S11796 + RecB, **c:** S11177*5/S11796*5 + RecB, **d:** S11177*3/S11796*3 + RecB, **e:** S11177*5 + RecB, **f:** S11178*3 + RecB, **g:** S11177*5/S11796, **h:** S12013 (FITC-markiertes Oligonukleotid, 5 nt).

Wie aus Abbildung 51 A ersichtlich, führte RecJ aus *C. glutamicum* zur Degradierung dsDNA ohne ssDNA-Ende. Im Gegensatz zu den Spuren e und f (hier wurden nur die Einzelstränge eingesetzt), waren hier vereinzelt noch Banden mit kürzeren Laufweiten als die finalen Abbauprodukte zu erkennen. In den Spuren a bis g waren kurze Reste der Substrat-DNA

sichtbar. Diese unterschieden sich in ihrer Laufweite. War das 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff besetzt (Spur b, d und e), lief dieses Fragmentstück weiter (Laufweite 3) im Gel als das am 5'-Ende markierte Fragment (Laufweite 1, Spur a, c und f). In den Spuren b und d tauchte noch eine weitere Bande bei ca. 5 nt auf (Laufweite 2). Zur besseren Einschätzung der Fragmentlängen wurden in Spur g das Fluoreszenz-markierte Oligonukleotid S12013 und in Spur h der Doppelstrang ohne Protein aufgetragen.

In Abbildung 51 B ist zu sehen, dass in den Spuren a bis d noch deutliche Banden auf Höhe der eingesetzten DNA-Substrate (zur Kontrolle in Spur g aufgetragen) vorhanden waren. Allerdings waren auch hier Abbauprodukte im unteren Bereich des Gels schwach zu erkennen, die sich wieder in Abhängigkeit der Position der FITC-Markierung in ihrer Laufweite unterschieden. So sind die Fragmente mit Fluoreszenz-Markierung am 3'-Ende etwas weiter im Gel gewandert (Laufweite 2) als die DNA-Stücke mit Markierung am 5'-Ende (Laufweite 1). Im Falle der ssDNA (Spur e und f) war, wie in Abbildung 51 A, eine vollständige Degradierung zu erkennen.

4 Diskussion

Zur Untersuchung des Einflusses von fehlenden Genen auf die Wirkung der DNA-Reparaturwege in *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden in dieser Arbeit insgesamt 19 verschiedene Gene deletiert. Bei der Wahl dieser Gene wurde darauf geachtet, dass diese ein großes Spektrum der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen abdecken. Es wurden Gene aus der Direkten Reparatur (DR), der Basenexzisionsreparatur (BER), der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und der Rekombinationsreparatur (RR) aus dem Genom entfernt. Da auch Mehrfachmutanten erstellt wurden, sind insgesamt 23 verschiedene Deletionsstämme entstanden, die zur weiteren Analyse mittels unterschiedlicher Mutagene charakterisiert wurden. Zur Übersicht ist in der folgenden Tabelle nochmals die Genausstattung bezüglich der DNA-Reparatur von *C. glutamicum* und dem Modelorganismus *E. coli* aufgeführt.

Tabelle 15: Genausstattung von *C. glutamicum* und *E. coli* bezüglich DNA-Reparatur
 Gene, die in dieser Arbeit deletiert wurden sind fett hervorgehoben, ◆ = Gen vorhanden und in *C. glutamicum* in dieser Arbeit deletiert, ◇ = Gen vorhanden

Reparaturweg	Gen	Protein/Funktion	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
Direkte Reparatur	<i>ogt</i>	Alkyltransferase	◆	◇
	<i>alkB</i>	Oxidative Demethylase	◆	◇
	<i>ada</i>	Alkyltransferase	◇	◇
	<i>mutT</i>	Oxoguanin-Triphosphatase	◇	◇
	<i>dut</i>	dUTP-Hydrolase		◇
	<i>phrB</i>	Photolyase	◇	◇
	Basenexzisionsreparatur	<i>ung</i>	Uracil-DNA-Glykosylase	◆
<i>mug</i>		G/U-Mismatch-DNA-Glykosylase		◇
<i>alkA</i>		3-Methyladenin-Glykosylase	◆	◇
<i>tagI</i>		3-Methyladenin-Glykosylase	◆	◇
<i>mutY</i>		Adenin-Glykosylase	◆	◇
<i>mutM</i>		Fapy-DNA-Glykosylase	◆	◇
<i>nei</i>		Endonuklease VIII	◆	◇
<i>nth</i>		Endonuklease III	◆	◇
<i>nfo</i>		Endonuklease IV		◇
<i>nfi</i>		Endonuklease V		◇
<i>xth</i>		Exonuklease III	◆	◇

Reparaturweg	Gen	Protein/Funktion	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
Nukleotidexzisionsreparatur	<i>uvrA</i>	Excinuklease Untereinheit A	◆	◇
	<i>uvrB</i>	ABC-Excinuklease Untereinheit B	◇	◇
	<i>uvrC</i>	ABC-Excinuklease Untereinheit C, Nuklease	◇	◇
	<i>uvrD</i>	3'-5'-Helikase II	◆	◇
Rekombinationsreparatur	<i>recA</i>	DNA-Rekombinase	◆	◇
	<i>recX</i>	Regulatorprotein für RecA		◇
	<i>recB</i>	UE der Exonuklease V/Helikase	◆	◇
	<i>recC</i>	UE der Exonuklease V		◇
	<i>recD</i>	UE der Exonuklease V		◇
	<i>recQ</i>	Helikase	◇	◇
	<i>recJ</i>	5'-3'-Exonuklease	◆	◇
	<i>recN</i>	Protein der SMC Familie	◇	◇
	<i>adnA</i>	Helikase/Nuklease	◆	
	<i>adnB</i>	Helikase/Nuklease	◆	
	<i>recF</i>	ssDNA und dsDNA-Bindung	◇	◇
	<i>recO</i>	ssDNA-Bindung/ Laden von RecA	◆	◇
	<i>recR</i>	ssDNA-Bindung/RecA-Stabilisierung	◇	◇
	<i>ssb</i>	Einzelstrang-Bindeprotein	◇	◇
	<i>ruvA</i>	DNA-Bindeprotein	◇	◇
	<i>ruvB</i>	holiday junction Helikase ATPase	◆	◇
	<i>ruvC</i>	holiday junction Resolvase	◇	◇
	<i>recG</i>	3'-5'-Helikase	◆	◇
	<i>sbcB</i>	ssDNA-Exonuklease		◇
	<i>sbcC</i>	dsDNA Exonuklease	◇	◇
<i>sbcD</i>	dsDNA Exonuklease	◇	◇	
<i>priA</i>	Neuaufbau des Primosoms	◇	◇	
Mismatch Reparatur	<i>mutS</i>	Erkennung von Fehlpaarungen		◇
	<i>mutL</i>	T:G-mismatch-Endonuklease	◇	◇
	<i>mutH</i>	mismatch-Endonuklease		◇

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist, sind *C. glutamicum* und *E. coli* vergleichbar ausgestattet. Der Modellorganismus *E. coli* ist jedoch deutlich besser untersucht und verfügt, gemäß der

verfügbaren Sequenzdaten, über eine etwas größere Genausstattung in Bezug auf die DNA-Reparaturmechanismen. Im Falle der DR besitzt *E. coli* zusätzlich noch das Gen *dut*, welches für die dUTP-Hydrolase codiert. Vergleicht man die BER beider Organismen, fällt auf, dass *E. coli* neben *nei* und *nth* noch über zwei weitere Gene verfügt, die für Endonukleasen codieren, welche für die Erkennung abasischer Stellen zuständig sind. Dabei handelt es sich um *nfo* und *nfi*. Außerdem fehlt *C. glutamicum* das Gen *mug*, welches in *E. coli* für die G/U-mismatch DNA-Glycosylase codiert. Betrachtet man die RR, wird deutlich, dass auch hier Unterschiede bestehen. Neben *recB* sind in *E. coli* auch *recC* und *recD* vorhanden. Die beiden letzteren Gene fehlen *C. glutamicum*. Allerdings trägt *C. glutamicum* *adnA* und *adnB*, deren orthologe Gene *addA* und *addB* aus *Bacillus subtilis* bereits als Ersatz für *recBCD* identifiziert wurden (Dillingham und Kowalczykowski 2008; Wigley 2013). In *Mycobacterium tuberculosis*, einem engen Verwandten von *C. glutamicum*, übernimmt AdnAB die Funktion der präsynaptischen Nuklease in der RecA-abhängigen homologen Rekombination (Sinha *et al.* 2009). Die Genausstattung der beiden Bakterien in Hinblick auf die NER ist identisch.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollten klären, welche Auswirkungen die Deletionen der verschiedenen Gene der DNA-Reparaturmechanismen auf die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* haben. Daraus sollten sich Erkenntnisse darüber ergeben, ob die in *C. glutamicum* vorhandenen Reparaturgene ähnliche Funktionen wie die in *E. coli* übernehmen und die DNA-Reparatur in gleicher Weise agiert.

4.1 Auswirkungen der Deletion von Genen der Direkten Reparatur auf die Überlebensfähigkeit nach Mutagenese

Zur Untersuchung der DR in *C. glutamicum* wurden die Gene *ogt* und *alkB* deletiert. *Ogt* codiert für die in *E. coli* konstitutiv exprimierte Methyltransferase Ogt, die einen Methylrest von der alkylierten Base auf einen spezifischen eigenen Cysteinrest überträgt (Olsson und Lindahl 1980). Neben Ogt ist noch Ada als eine weitere Methyltransferase vorhanden (McCarthy und Lindahl 1985; Schendel und Robins 1978; Teo *et al.* 1984). Die Expression der Methyltransferase Ada wird in *E. coli* durch DNA-Alkylierungen induziert (Schendel und Robins 1978). In einer vorangegangenen Studie wurden *ogt* und *ada* bereits in *E. coli* deletiert (Rebeck und Samson 1991). Das Fehlen dieser Gene führte in *E. coli* zu einer erhöhten Sensitivität

gegenüber dem alkylierenden Agens MNNG. Die irreversible Übertragung der Alkylgruppe von der beschädigten Base auf einen eigenen Cysteinrest führt zur Inaktivierung von Ogt. Übersteigt die MNNG-Konzentration einen Schwellenwert von 0,3 µg/ml, ist nicht mehr genügend Ogt aktiv um die Schäden zu beheben (Rebeck und Samson 1991). Die Behandlung der Mutante FD4 (Δogt) mit MNNG bestätigte diesen Sachverhalt in *C. glutamicum*. Wie erwartet, führt schon die geringste Dosis (0,4 µg/ml) dazu, dass keine Kolonien mehr gebildet werden (Abbildung 26). Das Fehlen von Ogt kann hier offensichtlich auch nicht durch Ada, dessen Homolog in *C. glutamicum* ebenfalls vorkommt, kompensiert werden. Da es sich bei der Methyltransferase Ada in *E. coli* um ein nicht konstitutiv exprimiertes Enzym handelt, dessen Induktion relativ langsam vonstatten geht (20 min) (Lemotte und Walker 1985), deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch in *C. glutamicum* die Induktion evtl. verzögert erfolgen könnte. Somit würde das Zusammenspiel von Ogt und Ada eine wichtige Rolle spielen. Die Methyltransferase Ogt würde also anfangs die Schäden durch Alkylierung abfangen. Nach und nach würde dabei Ogt inaktiviert, währenddessen die Expression von *ada* induziert werden würde. Fehlt Ogt, hätte die Zelle nicht genügend Zeit Ada zu bilden, sodass sich schädliche Mutationen manifestieren können.

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die Deletion von *ogt* in *C. glutamicum* keine Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Zeocin und Mitomycin C hatte. Die Überlebensraten lagen hier im Bereich des Referenzstammes ATCC 13032 (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Da diese Mutagene keine Schäden verursachen, die durch eine Übertragung einer Methylgruppe behoben werden könnten, entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen. Die Behandlung mit UV-Strahlung zeigte hingegen eine leichte Verbesserung der Überlebensfähigkeit nach der Deletion von *ogt* (Abbildung 23). Dieses Ergebnis lässt sich nicht erklären. Da UV-induzierte Schäden, wie CPDs oder das 6,4-PP, primär unter Beteiligung der NER repariert werden, sollten hier die Überlebensraten auch im Bereich derer des Referenzstammes liegen.

Zur Untersuchung der DR in *C. glutamicum* wurde neben *ogt* das Gen für die Demethylase AlkB deletiert. AlkB gehört zur Familie der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen. Vor allem 1-Methyladenin und 3-Methylthymine dienen als Substrat für dieses Enzym (Chen *et al.* 2016).

Für *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass AlkB nicht an der Reparatur potentiell toxischer Läsionen, wie 3-MeA, DSBs oder TSLs beteiligt ist. Auch AP-Stellen und inter- bzw. intrastranguläre *cross-links* können durch AlkB nicht repariert werden (Dinglay *et al.* 1998). Jedoch zeigten Mutanten ohne AlkB in *E. coli* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Alkylierungen durch S_N2 -spezifische Reaktionen, wie sie beispielsweise durch Ethylmethansulfonat (EMS) verursacht werden (Kataoka *et al.* 1983). S_N1 -spezifische Methylierungen, z.B. verursacht durch MNNG, rufen keine Aktivität von AlkB hervor. Dies wurde auch bei Untersuchungen von Streptomyceten (Grundmann 2012) beobachtet. Jedoch zeigte sich hier, dass sowohl MNNG als auch EMS in *Streptomyces lividans* (*S. lividans*) wohl nicht das von AlkB bevorzugt umgesetzte Hauptsubstrat 1-Methyladenin induzierten. Durch das Ergebnis der MNNG-Mutagenese hat sich auch in *C. glutamicum* bestätigt, dass die Reparatur MNNG-induzierter Schäden keine Beteiligung von AlkB zu erfordern scheint. Wie erwartet, lagen die Überlebensraten der *alkB*-Mutante im Bereich des Wildtyps von *C. glutamicum* (Abbildung 26).

Das Ergebnis der Zeocin-Mutagenese lässt vermuten, dass AlkB bei der Reparatur von DSBs oder TSLs eine Rolle spielt. Interessanterweise war bei der *alkB*-Mutante eine um 50% reduzierte Überlebensrate (im Vergleich zum Wildtyp) nach der Zugabe von 1,2 $\mu\text{g/ml}$ des Mutagens zu beobachten (Abbildung 24). Vergleichbare Untersuchungen von *S. lividans* zeigten, dass die Deletion von *alkB* keine Auswirkung auf das Überleben nach der Zugabe von Zeocin hatte (Grundmann 2012). Da nach der Induktion von DSBs oder TSLs hauptsächlich die Enzyme der RR zum Einsatz kommen und die Entfernung einer Alkylgruppe keine Relevanz hätte, ist dieses Ergebnis überraschend und lässt sich mechanistisch nicht erklären.

Nach der Behandlung mit UV-Licht und Mitomycin C zeigte die *alkB*-Mutante dagegen eine Verbesserung der Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 13032 (Abbildung 23 und Abbildung 25). Die Bestrahlung mit UV-Licht führte z.B. bei einer Strahlungsintensität von 60 J/m^2 zu einer Verbesserung der Überlebensfähigkeit der Mutante FD15 von über 20 Prozentpunkten im Vergleich zum Wildtyp. In *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass die Deletion von *alkB* keine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht hervorruft (Kataoka *et al.* 1983). In Streptomyceten hingegen wirkte sich die Deletion von *alkB* negativ auf das Überleben der Zellen nach der Behandlung mit UV-Licht und Mitomycin C aus (Grundmann 2012). Die überraschend erhöhte Vitalität von *C. glutamicum* gegenüber UV-Strahlung und Mitomycin C nach der Deletion von *alkB* ist vom Mechanismus her nicht nachzuvollziehen.

4.2 Folgen der Deletion verschiedener Gene aus der Basenexzisionsreparatur auf die Überlebensrate der Mutanten

Die BER ist der Hauptreparaturweg für kleine Basen-Läsionen, die die Struktur der DNA nicht verändern. In dieser Arbeit wurden mehrere Gene dieses Reparaturweges deletiert, um deren Funktion bei der Behebung verschiedener induzierter Schäden zu bestimmen. Der Mechanismus der BER beinhaltet die Erkennung des Schadens durch eine sog. DNA-Glykosylase. Diese entfernt dann die beschädigte Base und hinterlässt eine Stelle ohne gebundene Purin- oder Pyrimidinbase (AP-Stelle). Durch AP-Endonukleasen oder -Lysasen, einer DNA-Polymerase und einer Ligase wird diese Stelle dann weiter behandelt.

Es wurde bereits gezeigt, dass *C. glutamicum* über verschiedene DNA-Glykosylasen verfügt. Es handelt sich dabei unter anderem um die Uracil-DNA-Glykosylase Ung, die 3-Methyladenin-DNA-Glykosylasen TagI und AlkA, die Adenin-Glykosylase MutY und die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase MutM. Wie aus Tabelle 15 ersichtlich wird, besitzt *E. coli* eine weitere DNA-Glykosylase. Die G/U-mismatch-DNA-Glykosylase Mug fehlt in *C. glutamicum*. Neben den Glykosylasen, wurden in dieser Arbeit auch die Funktionen der Glykosylasen mit Endonukleaseaktivität Nei und Nth, sowie der Exonuklease Xth untersucht. Die Endonukleasen Nfo und Nfi fehlen in *C. glutamicum*.

Die Bestrahlung der verschiedenen Mutanten mit UV-Licht zeigte, dass Schäden, die durch dieses Mutagen verursacht werden, nicht unter Beteiligung der untersuchten DNA-Glykosylasen repariert wurden (Abbildung 27 A). Die Überlebensraten der verschiedenen Deletionsmutanten lagen im Bereich des Ausgangsstammes ATCC 13032 und deuten darauf hin, dass zur Entfernung von CPDs oder 6,4-PPs ein anderes Reparatursystem zuständig ist. Da UV-Strahlung sowohl direkt als auch indirekt Schäden verursacht, die auch von der BER behoben werden können, wäre hier eine Beteiligung einzelner Gene, wie der Endonukleasen, vorstellbar. Jedoch konnte dies bei dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In *Micrococcus luteus* ist eine DNA-Glykosylase bekannt, die UV-Schäden reparieren kann, jedoch nicht in *E. coli* oder *C. glutamicum* (Grafstrom et al. 1982; Gordon und Haseltine 1980). Wie in *E. coli*, ist hierfür vermutlich auch in *C. glutamicum* die NER primär verantwortlich.

Auch nach der Behandlung mit Zeocin war kein signifikanter Unterschied in der Überlebensfähigkeit der Mutanten der DNA-Glykosylasen im Vergleich zum Wildtyp

erkennbar Abbildung 28 A). Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da zur Reparatur dieser Schäden die Gene der RR benötigt werden. So konnte zum Beispiel auch in dem Modellorganismus *E. coli* beobachtet werden, dass die Reparatur von DSBs ohne Beteiligung der BER abläuft.

Nach der Zugabe von Mitomycin C zeigte sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 29 A). Die Deletionsmutanten ohne DNA-Glykosylasen waren ähnlich resistent gegenüber diesem Mutagen wie der Referenzstamm ATCC 13032. Da Mitomycin C DNA-Addukte bildet, die eher als Substrat für die NER dienen, dürfte wahrscheinlich auch in *C. glutamicum* dieser Mechanismus für die Behebung der Schäden durch Mitomycin C verantwortlich sein.

Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von MNNG einen deutlichen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Deletionsmutanten FD2 ($\Delta alkA$), FD10 ($\Delta tagI$) und FD12 ($\Delta mutY$) (Abbildung 30 A). Das Fehlen der 3-MeA-DNA-Glykosylase AlkA verursachte eine deutlich geringere Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp. Nach der Zugabe von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ MNNG lag die durchschnittliche Überlebensrate schon ca. 17 Prozentpunkte unterhalb des Ausgangsstammes ATCC 13032. Einen dramatischeren Effekt hatte allerdings die Deletion von TagI (ebenfalls eine 3-MeA-DNA-Glykosylase). Die Überlebensrate lag bei diesem Stamm ungefähr 43 Prozentpunkte unterhalb der durchschnittlichen Überlebensrate des Wildtyps nach der Zugabe von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ MNNG. Ebenso führte die Deletion von *mutY* zu einer drastischen Verschlechterung der Überlebensfähigkeit nach der Behandlung mit MNNG. Die Untersuchung der Mehrfachmutanten FD11 ($\Delta tagI, alkA$) und FD13 ($\Delta tagI, alkA, mutY$) zeigte, dass die gleichzeitige Deletion einer weiteren DNA-Glykosylase keine weitere Reduktion der Überlebensfähigkeit im Vergleich zur Einzelmutante $\Delta tagI$ bewirkte. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei TagI um die wichtigste Glykosylase bei der Reparatur durch MNNG methylierter Basen handelt. Sind *alkA* oder *mutY* alleine deletiert, kann hier jeweils ein redundantes System die Reparatur übernehmen. Bei TagI handelt es sich um eine DNA-Glykosylase mit einem sehr engen Substratspektrum. Dieses Enzym ist für die Entfernung von 3-MeA aus der DNA zuständig. AlkA hingegen, verfügt über ein weites Substratspektrum und erkennt neben 3-MeA auch 3-Methylguanin, O²-Methylpyrimidine und 7-Methylguanin (Karran *et al.* 1982; McCarthy *et al.* 1984; Bjelland *et al.* 1993). Außerdem wird TagI in *E. coli* konstitutiv exprimiert, die Expression von *alkA* wird durch nicht-lethale Konzentrationen alkylirender Substanzen induziert (Lindahl *et al.* 1988; Bjelland *et al.* 1993). Auch in dem mit

C. glutamicum eng verwandten Organismus *Mycobacterium tuberculosis* wurde die Induktion der Expression von *alkA* durch alkylierende Substanzen nachgewiesen (Boshoff *et al.* 2003). Es ist also vorstellbar, dass die Genexpression von *alkA* auch in *C. glutamicum* induzierbar ist. Somit steht TagI schneller zur Verfügung. Dies hat zur Folge, dass 3-MeA von AlkA weniger effizient aus der DNA entfernt wird als von TagI. Die Ergebnisse der MNNG-Mutagenese lassen sich also so erklären, dass die mutagene Wirkung von MNNG in *C. glutamicum* hauptsächlich zur Bildung von 3-MeA führt und dieses primär unter der Beteiligung von TagI repariert wird.

In Abbildung 30 A ist außerdem zu erkennen, dass die Deletion des Gens für die Uracil-DNA-Glycosylase Ung keine Abnahme der Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp nach der Zugabe von MNNG verursachte. Dies entspricht den Erwartungen, da Ung für die Entfernung von Uracil aus der DNA verantwortlich ist und keine methylierten Basen erkennt. Der Deletionsstamm FD6 (Δung) scheint sogar etwas besser auf die Behandlung mit MNNG zu reagieren. Bei der MNNG-Konzentration 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, so war die Überlebensrate von FD6 im Vergleich zum Referenzstamm um etwa 10 Prozentpunkte erhöht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Einbau von Uracil in die DNA zunächst weniger schädlich für den Organismus ist, als die Bildung einer AP-Stelle durch die Entfernung der Base. Der Einbau von Uracil während der Replikation ist an sich nicht problematisch, da Uracil vorwiegend mit Adenin gepaart wird. Jedoch kann auch durch spontane Desaminierung von Cytosin Uracil in der DNA entstehen. Diese Mutation muss entfernt werden. Untersuchungen von *S. lividans* zeigten ebenfalls keine erhöhte Empfindlichkeit der *ung*-Mutante gegenüber MNNG (Grundmann 2011).

Interessanterweise führte die Deletion von *mutM* zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch in diesem Fall wies die Deletionsmutante (FD5) eine erhöhte Resistenz gegenüber MNNG auf. Bei MutM handelt es sich um eine Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase. Diese erkennt 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-OxoG), 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FapyA) und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) und entfernt diese aus der DNA. Neben der hydrolytischen Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der geschädigten Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, beinhaltet MutM auch noch eine eigene AP-Lyase-Aktivität. MutM löst die Phosphodiesterbindung an der AP-Stelle auf und hinterlässt an dieser Stelle entweder ein α , β -ungesättigtes Aldehyd (β -Eliminierung) oder ein Phosphat (β , δ -Eliminierung) (Lindahl und Barnes 2000; Krokan *et al.* 2000). Dass das Fehlen dieses Enzyms in *C. glutamicum* eine verbesserte Resistenz gegenüber dem alkylierenden Agens MNNG

verursachte, lässt sich nicht erklären. Die Zugabe von MNNG bewirkte beispielsweise in *S. lividans* eine Reduktion der Überlebensfähigkeit der *mutM*-Mutante, da in Streptomycceten kein Enzym mit annähernd gleicher Funktion vorhanden ist (Grundmann 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass dies in *C. glutamicum* evtl. der Fall ist. Außerdem haben vorangegangene Studien bereits gezeigt, dass *mutM*-Mutanten von *E. coli* keine erhöhte Sensibilität gegenüber UV-Strahlung und Mitomycin C aufweisen (Boiteux und Huisman 1989). Auch in dieser Arbeit war keine Reduktion der Überlebensraten nach UV-Bestrahlung und MMC-Behandlung erkennbar.

Neben den DNA-Glykosylasen wurden auch die Gene für die Endonukleasen III (*Nth*) und VIII (*Nei*) und die Exonuklease *Xth* aus *C. glutamicum* deletiert. Es ist bereits bekannt, dass *Nth*, neben der Entfernung oxidierter Purine aus der DNA, auch über eine AP-Lyase-Aktivität verfügt (Asahara *et al.* 1989; Breimer und Lindahl 1984; Hatahet *et al.* 1994; Katcher und Wallace 1983). Auch bei der Endonuklease VIII *Nei* handelt es sich um eine DNA-Glykosylase mit AP-Lyase Aktivität. In Abbildung 27 B wurden die Ergebnisse der UV-Mutagenese zusammengefasst. Die Überlebensfähigkeit der Zellen war durch das Fehlen der Exonuklease *Xth* nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung von *S. lividans* gezeigt, dass das Fehlen von *Xth* einen negativen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen hatte (Grundmann 2012). Weiterhin zeichnete sich ab, dass die Deletion von *nth* und *nei* in *C. glutamicum* die Resistenz der Zellen gegenüber UV-Strahlung nicht beeinflusste. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht war die Überlebensrate der Einzelmutanten FD8 (Δnei) und FD9 (Δnth) zwar leicht um durchschnittlich ca. 15 Prozentpunkte erhöht. Da die Werte der Doppelmutante FD14 allerdings wieder innerhalb der Streubreite des Referenzstammes ATCC 13032 lagen, könnte man dieses Ergebnis auf Rauschen zurückführen. Es war zu erwarten, dass die UV-Mutagenese keine reduzierten Überlebensraten der Deletionsmutanten aus der BER hervorruft. Für die Reparatur UV-induzierter Schäden ist vermutlich, wie in *E. coli*, primär die Nukleotidexzisionsreparatur zuständig.

Die Deletionsmutanten FD8 (Δnei), FD9 (Δnth), FD14 ($\Delta nei/nth$) und FD19 (Δxth) zeigten auch keine erhöhte Empfindlichkeit nach Behandlung mit Zeocin (Abbildung 28 B). Da Zeocin DSBs verursacht war hier auch keine Beteiligung seitens der BER zu erwarten.

Die mutagene Wirkung von Mitomycin C beruht auf der Bildung von Quervernetzungen zwischen zwei DNA-Strängen. Diese Schäden werden primär durch die NER und die RR behoben. Außerdem führt die Behandlung mit Mitomycin C zu Basenmodifikationen, die unter Beteiligung von DNA-Glykosylasen repariert werden könnten. In Abbildung 29 B ist jedoch ein deutlich negativer Einfluss auf die Überlebensraten der Deletionsstämmen nach Zugabe von Mitomycin C zu erkennen. Vor allem die Endonuklease III (Nth) scheint direkt an der Reparatur MMC-induzierter Schäden beteiligt zu sein. Das Fehlen dieses Enzyms konnte offensichtlich auch nicht durch die Endonuklease VIII (Nei) kompensiert werden. Auch die Deletion von Nei bewirkte eine geringere Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* nach der Zugabe von MMC. Die Exonuklease Xth scheint hingegen keine Rolle bei der Behebung MMC-induzierter Läsionen zu spielen. Die Deletionsmutante FD19 (Δxth) verhielt sich exakt wie der Wildtyp von *C. glutamicum*.

Bei der Reparatur von Basenmodifikationen, wie sie von MNNG verursacht werden, wird bekanntermaßen die BER benötigt. Dementsprechend waren auch die Deletionen von *nei* und *nth* ursächlich für eine geringere Überlebensfähigkeit nach der Behandlung mit MNNG. In Abbildung 30 B wird ersichtlich, dass hier die Einzeldelationen von *nei* bzw. *nth* einen geringeren Effekt hatten, als die gleichzeitige Deletion der beiden Endonukleasen. Das heißt, in diesem Fall kann die eine Endonuklease das Fehlen der anderen in einem gewissen Maß kompensieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass nach der Entfernung einer alkylierten Base durch eine DNA-Glykosylase, die Reparatur durch eine Endonuklease fortgeführt werden muss (Ausnahme: MutM besitzt eine eigene AP-Lyase-Funktion). Ohne die entsprechende Nuklease bleibt eine AP-Stelle bestehen, was wiederum zu Fehlern bei der Replikation führen kann. Die Aktivität der AP-Endonukleasen während der BER ist also auch in *C. glutamicum* essentiell. Im Modellorganismus *E. coli* spielt auch die Exonuklease Xth eine wichtige Rolle und ist für 80 % der zellulären AP-Endonuklease-Aktivität zuständig (Weiss 1981; Kow 1989). Dies konnte für die BER in *C. glutamicum* nicht bestätigt werden. Xth scheint hier nur eine untergeordnete Funktion zu haben.

4.3 Charakterisierung der Deletionsmutanten der Nukleotidexzisionsreparatur

Um die Auswirkungen der Deletionen der Gene der NER in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden zwei der vier bekannten Reparaturgene deletiert, die in diesen Mechanismus involviert sind. Dazu wurden die Gene für die Excinuklease-Untereinheit UvrA und die Helikase UvrD aus dem Genom von *C. glutamicum* entfernt. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der UV-Mutagenese zusammengefasst. UV-Strahlung verursacht in erster Linie DNA-Schäden, welche die Struktur der Doppelhelix verändern. Durch die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPDs) oder dem 6,4-Photoprodukt (6,4-PP) kann dann z.B. die Replikation blockiert werden. Die Behebung solcher Läsionen ist daher für jeden Organismus enorm wichtig. Die Reparatur UV-induzierter Schäden wird primär von der NER übernommen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass auch in *C. glutamicum* die NER, neben der DR über die Photolyase, hauptsächlich für die Reparatur von CPDs oder 6,4-PPs zuständig ist. Da die Zellen nach der Bestrahlung mit UV-Licht vollständig im Dunkeln gehalten wurden, konnte die DR mittels Photolyase ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass schon bei einer Strahlungsintensität von 3 J/m^2 die Überlebensfähigkeit der beiden Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp drastisch abnahm. Während der Ausgangsstamm ATCC 13032 diese Strahlen-Dosis ohne signifikante Abnahme der Überlebensrate tolerierte, lagen die durchschnittlichen Werte von FD1 ($\Delta uvrD$) bei nur noch knapp 40 % und von FD3 ($\Delta uvrA$) bei nur noch ca. 20 %. Schon nach der Bestrahlung mit 5 J/m^2 wurden keine heranwachsenden Kolonien mehr gebildet. Dieser drastische Effekt macht die Bedeutung UV-induzierter Schäden und deren Nicht-Behebung deutlich.

Interessanterweise zeigte auch die Zugabe von Zeocin einen Einfluss auf die Überlebensraten der Deletionsmutanten aus der NER (Abbildung 32). Sowohl die Deletion von *uvrA* als auch die Deletion von *uvrD* führte zu einer geringeren Toleranz gegenüber dem DSB-induzierenden Mutagen. So konnte beobachtet werden, dass bei Zugabe von $1,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ des Mutagens bereits keine Kolonien mehr wuchsen, wenn *uvrA* bzw. *uvrD* deletiert war. Vom Ausgangsstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 waren bei dieser Zeocin-Konzentration noch knapp 90 % der Zellen überlebensfähig. Obwohl DSBs unter Beteiligung der RR behoben werden, ist hier also ein Einfluss der Enzyme aus der NER erkennbar. Im Falle von UvrD lässt sich dies dadurch erklären, dass die Helikase UvrD auch bei der RR assistieren kann (Mendonca *et al.* 1993). Die

Beteiligung der Excinuklease-Untereinheit UvrA auf die Reparatur dieser Schäden lässt sich nicht eindeutig klären.

Ebenso zeichnete sich ein gewisser Zusammenhang zwischen der NER und Schäden, die durch Mitomycin C (MMC) hervorgerufen werden, ab. Wie in Abbildung 33 zu sehen, hatte die Deletion von *uvrA* einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit nach der Behandlung mit MMC. Nur noch knapp 20 % der Zellen tolerierten eine MMC-Konzentration von 25 µg/ml. Beim Wildtyp und der *uvrD*-Mutante waren es immerhin noch 50 %.

Nach der Behandlung der verschiedenen Stämme mit dem Mutagen MNNG fiel auf, dass die Mutanten der NER auch hier veränderte Überlebensraten im Vergleich zum Wildtyp von *C. glutamicum* aufwiesen. Hier bewirkte die Deletion von *uvrD* eine um 20 Prozentpunkte verringerte Überlebensrate im Vergleich zu ATCC 13032 bei einer MNNG-Konzentration von 0,8 µg/ml. War *uvrA* deletiert, war dagegen die Überlebensrate bei dieser MNNG-Dosis um 20 Prozentpunkte höher als die des Wildtyps. Da MNNG Alkylgruppen an einzelne Basen addiert und diese aus der DNA entfernt werden müssen, wird hier primär die BER angesprochen. Da aber auch die Gene der NER diese Läsionen erkennen können, dient dieses System als Sicherheitssystem für die Reparatur dieser Schäden. Die Beteiligung von UvrA bzw. UvrD an der Reparatur dieser Läsionen in *C. glutamicum* ist also nicht überraschend (Abbildung 34). Dass die Deletion von *uvrA* jedoch die Überlebensfähigkeit der Zellen nach der Zugabe von MNNG positiv beeinflusst, lässt sich hier nicht erklären.

4.4 Auswirkungen der Deletion verschiedener Gene aus der Rekombinationsreparatur auf die Überlebensraten der Stämme

Die RR wird dann angesprochen, wenn ein Schaden beide DNA-Stränge der Doppelhelix betrifft. Hierbei muss die zur Reparatur nötige Sequenzinformation von einem Schwesterchromosom zur Verfügung gestellt werden. Um die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* mit Mutationen in den Genen der RR genauer zu untersuchen, wurden mehrere Gene für Enzyme aus diesem Reparaturmechanismus aus dem Genom entfernt.

Mit *recA* wurde das entscheidende Enzym aus der synaptischen Phase der RR aus dem Genom von *C. glutamicum* deletiert. Da dieses Enzym die Zellen auch zur HR befähigt und somit den

Erhalt der genomischen Integrität gewährleistet, war zu erwarten, dass die Deletion dieses Gens drastische Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* hat. Durch die Ergebnisse der einzelnen Mutagenese-Experimente wurde diese Annahme bestätigt. Die Mutante FD7 ($\Delta recA$) zeigte nach der Behandlung mit UV-Strahlung, Zeocin, MCC und MNNG eine deutliche Reduktion der Überlebensraten im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 (Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38). Die hohe Sensibilität gegenüber den verschiedenen Mutagenen war außerdem auf die Rolle von RecA bei der SOS-Antwort zurückzuführen.

Bei RecJ handelt es sich um eine 5'→3'-ssExonuklease, die gemeinsam mit der 3'→5'-Helikase RecQ 3'-Überhänge für die RR über den RecFOR-Weg erzeugt (Morimatsu und Kowalczykowski 2003). Außerdem wird mit Hilfe dieser beiden Enzyme auch der Folgestrang an blockierten Replikationsgabeln für die Wiederaufnahme der Replikation prozessiert (Courcelle und Hanawalt 1999). Die Deletion von *recJ* führte in *C. glutamicum* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Zeocin (Abbildung 36). Selbst die Zugabe der höchsten Konzentration des Mutagens (2 µg/ml) wurde noch von 84 % der Zellen toleriert. Alle anderen Stämme, wie auch der Wildtyp, konnten bei dieser Zeocin-Dosis keine Kolonien mehr bilden. Da Zeocin direkt DSBs verursacht und somit die RR anspricht, war zu erwarten, dass die Deletion von *recJ* eine erhöhte Sensibilität gegenüber diesem Mutagen bewirkt. Dass dies hier nicht der Fall ist, könnte man zum einen so erklären, dass RecJ in *C. glutamicum* für die Reparatur Zeocin-induzierter Schäden nicht benötigt wird. Wie bereits erwähnt, fehlt in *C. glutamicum* das RecBCD-System, welches für die Bildung eines 3'-Überhang-Endes benötigt wird. Wie in Mycobakterien, könnte diese Aufgabe im hier untersuchten *C. glutamicum* vom AdnAB-System übernommen werden. Dieses stellt ein Helikase/Nuklease-System dar, welches die Doppelstrangenden für die RecA-abhängige homologe Rekombination prozessiert (Gupta *et al.* 2011). Es ist wahrscheinlich, dass RecJ die dabei entstehenden 3'-überhängenden ssDNA-Enden durch eine integrierte Endonukleaseaktivität abbaut und somit die Bindung von RecA verhindert wird. Diese Vermutung wurde durch *in vitro*-Untersuchungen untermauert (siehe 3.7) und wird im Weiteren nochmals genauer diskutiert (siehe 4.5).

Nach der UV-Mutagenese wurde deutlich, dass RecJ bei der Reparatur UV-induzierter Schäden keine Rolle spielt. Hier greift hauptsächlich die NER. Auch nach der Behandlung mit MMC deutet alles darauf hin, dass RecJ in *C. glutamicum* keine Aufgabe bei der Reparatur von DNA-

Addukten oder Quervernetzungen übernimmt. Außer bei einer MMC-Konzentration von 50 µg/ml, überlappten sich die einzelnen Messwerte mit denen des Wildtyps ATCC 13032 größtenteils, so dass bei diesem Mutagen RecJ offensichtlich keine Rolle spielt. Interessanterweise führte die Deletion von RecJ jedoch zu einer deutlichen Verringerung der Toleranz gegenüber MNNG (Abbildung 38). Die Überlebensraten lagen etwa 50 Prozentpunkte unterhalb der Werte des Referenzstammes ATCC 13032. Dies deutet darauf hin, dass RecJ eine Rolle bei der Reparatur alkylierter Basen in *C. glutamicum* spielen könnte. So könnte nach der Entfernung der alkylierten Base und der Ausbildung eines Strangbruchs durch eine Endonuklease, RecJ einen Einzelstrang abbauen, welcher im Anschluss wieder aufgefüllt wird. Außerdem kann nach der Entfernung des veränderten Nukleotids bei der BER der Fall auftreten, dass noch ein Teil des angrenzenden DNA-Stranges abgelöst wird (*engl.: Flap*). Nach dieser Abspaltung durch Flap-Endonukleasen werden die fehlenden Nukleotide wieder durch DNA-Polymerasen ersetzt. Bei diesem Prozess könnte eine weitere Exonuklease (z.B. RecJ) benötigt werden.

In *E. coli* und vielen anderen Bakterien ist der RecBCD-Weg der am häufigsten genutzte Weg der RR. Alternativ dazu, haben einzelne Bakterien ein anderes Helikase/Nuklease-System entwickelt. *Bacillus subtilis* z.B., besitzt die Gene *addA* und *addB*, die die Funktion von RecBCD übernehmen (Chedin und Kowalczykowski 2002). In Mycobakterien wurde analog dazu das AdnAB-System identifiziert, dessen Homolog auch in *C. glutamicum* vorhanden ist (Sinha *et al.* 2009). Da im hier untersuchten Organismus *C. glutamicum* nur *recB* aus dem Enzymkomplex RecBCD vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass AdnAB bzw. RecJ, RecQ und RecFOR die entscheidende Rolle bei der Reparatur von DSBs übernehmen. Da RecB nur als Untereinheit des RecBCD-Holoenzym, beziehungsweise in *recD*-Mutanten als Untereinheit der RecBC-Helikase bekannt ist, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Funktionsweise von RecB noch weiter untersucht werden. Ob RecB auch ohne RecC und RecD eine Rolle bei der RR spielt, sollte durch die Mutagenese der Mutante FD46 bestimmt werden. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht konnte keine Abweichung der Überlebensraten des Deletionsstammes zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 35). Wurde Mitomycin C zu den Zellen gegeben, so zeigte die *recB*-Mutante eine verringerte Überlebensfähigkeit (Abbildung 37). Auch nach der Behandlung mit MNNG führte das Fehlen von RecB zu einer verringerten Toleranz gegenüber dieser alkylierenden Substanz (Abbildung 38). Die Zeocin-

Mutagenese, die durch die Induktion von DSBs direkt die RR ansprechen sollte, zeigte ebenfalls einen Effekt auf die Überlebensfähigkeit dieser Mutante. In Abbildung 36 ist zu sehen, dass eine Zugabe von 0,8 µg/ml Zeocin noch keine Auswirkung auf die Überlebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zum Wildtyp hatte. Erst die Behandlung mit 1,2 µg/ml des Mutagens führte dazu, dass kaum noch Kolonien heranwuchsen. Der Referenzstamm ATCC 13032 brachte bei dieser Dosis hingegen noch fast 90 % überlebensfähige Zellen hervor. RecB scheint also auch ohne das Zusammenspiel mit RecC und RecD eine Aufgabe bei der RR zu übernehmen.

Zur Untersuchung der Funktion von AdnAB in *C. glutamicum* wurden die Gene *adnA* und *adnB* gemeinsam deletiert. Die Ergebnisse bei Behandlung der Mutante mit den vier verschiedenen Mutagenen zeigten, dass der Enzymkomplex ein wichtiger Bestandteil der DNA-Reparatur ist. Die Behandlung mit Zeocin, MMC und MNNG ergab, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen ohne AdnAB deutlich beeinträchtigt war. AdnAB scheint also auch in *C. glutamicum* essentiell zu sein, indem es vermutlich die Rolle von RecBCD übernehmen kann. Diese Vermutung wurde durch die Charakterisierung der Doppelmutante FD47 ($\Delta adnAB/recB$) noch untermauert. Hier zeigte sich keine weitere Abnahme der Überlebensraten wenn zusätzlich RecB aus dem Genom entfernt wurde. Schlussfolgernd kann also davon ausgegangen werden, dass RecB allein nur eine untergeordnete Rolle bei der RR spielt und die Bereitstellung des 3'-überstehenden DNA-Einzelstrangs für die Bindung von RecA hauptsächlich durch AdnAB bewirkt wird. Auch in Mycobacterien wurde dieser Sachverhalt ebenfalls beobachtet. Der $\Delta adnAB \Delta recBCD$ -Stamm zeigte hier keine größere Empfindlichkeit als die $\Delta adnAB$ -Mutante (Sinha et al. 2009).

In *C. glutamicum* sind alle Gene für das RecFOR-System vorhanden. Im Zuge dieser Arbeit konnte jedoch nur *recO* erfolgreich deletiert werden. RecF und RecR scheinen in *C. glutamicum* essentiell zu sein. Auch in *S. lividans* konnten *recF* und *recR* nicht als gesamte Gene deletiert werden (Grundmann 2012). Da RecO als Untereinheit des Enzymkomplexes fungiert, sollte es möglich sein, durch die Untersuchung der entsprechenden Deletionsmutante (FD17) auf die Rolle von RecFOR in *C. glutamicum* zu schließen. Das Fehlen von RecO führte bei der Mutante zu einer drastischen Reduktion der Überlebensfähigkeit bei allen der vier verwendeten Mutagene. Hierdurch wird der Stellenwert der Homologen Rekombination, die hier offensichtlich über den RecFOR-Weg erfolgt, für den Erhalt der

genomischen Integrität deutlich. Diese Ergebnisse bestätigen auch Untersuchungen in anderen Organismen, wie beispielsweise *Deinococcus radiodurans* (Xu et al. 2008a). In *Mycobacterium smegmatis* wurde durch die gleichzeitige Deletion von *recO* und *adnAB* gezeigt, dass durch das Fehlen dieser Enzyme praktisch keine HR mehr stattfinden konnte (Gupta et al. 2013). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die HR in Mycobacterien nur über diese beiden Wege erfolgen kann. Auch für *C. glutamicum* wäre dies vorstellbar und müsste durch die gleichzeitige Deletion von *recO* und *adnAB* untersucht werden.

Schon nach der Bestrahlung mit einer UV-Strahlungsintensität von 8 J/m² konnten nur sehr wenige heranwachsende Kolonien der *recO*-Mutante detektiert werden, während die Überlebensfähigkeit des Wildtyps bei dieser Strahlen-Dosis nicht beeinflusst war (Abbildung 35). Auch die Zeocin-Mutagenese zeigte eine deutliche Abnahme der Überlebensfähigkeit der Zellen, wenn *recO* deletiert war. Bereits eine Zeocin-Konzentration von 0,8 µg/ml wurde von dieser Mutante nicht mehr toleriert (Abbildung 36). Im Vergleich dazu waren noch ca. 90 % der Zellen des Ausgangsstammes ATCC 13032 überlebensfähig. Ebenso zeigte die Mutagenese mit MMC und MNNG eine signifikant reduzierte Toleranz der Mutante gegenüber diesen Substanzen (Abbildung 37 und Abbildung 38). Offensichtlich gehört die Reparatur über den RecFOR-Weg zu den entscheidenden Mechanismen bei der Behebung von DNA-Schäden in *C. glutamicum*. Dies könnte darin begründet sein, dass mittels AdnAB zwar die 3'-überhängenden Enden gebildet werden, das Laden mit RecA aber nur über RecFOR erfolgen kann. Somit sind die Gene *recF*, *recO* und *recR* essentiell.

In der postsynaptischen Phase sind RuvA, RuvB, RuvC und RecG die Hauptakteure in der RR (siehe 1.3.4.3). Die Funktionen von RuvABC und RecG überschneiden sich teilweise. Während RuvABC die Überkreuzungsstrukturen (*Holliday Junctions*) verschieben und auflösen kann, kann RecG die Überkreuzungsstrukturen verschieben, aber nicht auflösen. Es war zu erwarten, dass die Einzeldelationen von *recG* und *ruvB* die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* kaum beeinflussen. Da RuvB und RecG sich in ihren Funktionen komplementieren sollten und RuvC in beiden Fällen die *Holliday Junctions* auflösen sollte. So zeigte die Mutante FD22 ($\Delta recG$) ähnliche Überlebensraten nach der Behandlung mit den Mutagenen Zeocin und MMC wie FD21 ($\Delta ruvB$). Interessanterweise führte sowohl die Deletion von *ruvB* als auch die von *recG* zu einer deutlich verringerten Überlebensfähigkeit der Zellen bei Verwendung von Zeocin als Mutagen. In Abbildung 36 ist zu sehen, dass schon die Zugabe von 0,8 µg/ml des Mutagens

von den Deletionsstämmen nicht mehr toleriert wurde, während bei dieser Dosis noch ca. 95 % des Wildtyps überlebensfähig waren. Die Mutagenese mit MMC führte ebenfalls dazu, dass die Deletionsmutanten FD21 ($\Delta ruvB$) und FD22 ($\Delta recG$) im Vergleich zum Ausgangsstamm ATCC 13032 sehr viel weniger heranwachsende Kolonien hervorbrachten. Schon nach der Zugabe von 25 $\mu\text{g/ml}$ waren im Durchschnitt noch knapp 13 % der Zellen ohne RecG überlebensfähig (siehe Abbildung 37), bei der *ruvB*-Mutante waren es knapp 3 %, während vom Wildtyp noch 83 % der Zellen diese MMC-Konzentration tolerierten. Es handelt sich bei RuvAB und RecG also um kein redundantes System in *C. glutamicum*.

Ein größerer Unterschied der beiden Mutanten zeigte sich nach der Bestrahlung mit UV-Licht. Die Mutante ohne RuvB wies, im Vergleich zum Wildtyp, eine geringere Toleranz gegenüber diesem Mutagen auf. Bei einer Strahlungsintensität von 10 J/m^2 waren im Durchschnitt etwa 30 % der Zellen der *ruvB*-Mutante überlebensfähig. Wurde *recG* deletiert, hatte dies keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen (Abbildung 35). UV-Licht verursacht Schäden, die in erster Linie die NER erfordern. Blockieren diese Schäden (z.B. CPDs) allerdings den Replikationsapparat, entstehen nach Abbruch und strangabwärts stattfindender Wiederaufnahme der Replikation, Tochterstranglücken (TSLs), die die RR erfordern. Alternativ dazu, können blockierende Läsionen die Regression der Replikationsgabel verursachen (McGlynn und Lloyd 2002b; Friedberg 2006). Sind beide DNA-Stränge von einer blockierenden Läsion betroffen (z.B. DNA-Crosslink durch MMC), wird nach der Regression das RuvABC-System zur Auflösung der Überkreuzungsstruktur benötigt (McGlynn und Lloyd 2002b), da hier zur Wiederaufnahme der Replikation die entstandenen doppelsträngigen Enden mit dem intakten Strang verpaart werden müssen. Dies wird durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt. Ist nur ein Strang von der blockierenden Läsion betroffen (z.B. CPDs durch UV-Licht), kann durch die Regression der Schaden für die Exzisionsreparatur wieder zugänglich gemacht werden, da dieser dann nicht mehr vom Replisom bedeckt ist (McGlynn und Lloyd 2002b). Die Regression der Replikationsgabel erfolgt dabei nicht spontan, sondern unter Einfluss von RecG (McGlynn und Lloyd 2001a; McGlynn und Lloyd 2002a; McGlynn und Lloyd 2001b). RuvABC hingegen kann die Überkreuzung zwar auflösen, aber sie kann die Replikationsgabel nicht so entwinden, dass solche Überkreuzungsstrukturen entstehen (McGlynn *et al.* 2001). Es wäre also zu erwarten gewesen, dass RuvABC bei der Behandlung mit UV-Licht eine eher untergeordnete Rolle spielt, da eine Auflösung der Überkreuzungsstrukturen nicht nötig wäre.

Warum hier die Deletion von *ruvB* dennoch einen stärkeren Effekt auf die Überlebensrate der Zellen hatte, lässt sich nicht eindeutig erklären.

Nach der Mutagenese mit MNNG hatte das Fehlen von RuvB ebenfalls einen negativeren Einfluss auf die Überlebensfähigkeit als das Fehlen von RecG (Abbildung 38). Im Falle der Mutante FD22 ($\Delta recG$) konnte nach der Zugabe von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ des Mutagens noch eine durchschnittliche Überlebensrate der Zellen von etwa 17 % ermittelt werden. Bei der Mutante FD21 ($\Delta ruvB$) waren bei dieser MNNG-Dosis schon keine Kolonien mehr gewachsen. Im Vergleich dazu, brachten noch über 90 % der Zellen des Referenzstammes heranwachsende Kolonien hervor. Die durch die Zugabe von MNNG induzierten Schäden sprechen primär die BER an. Es war also zu erwarten, dass hier keine Unterschiede zwischen den Mutanten FD21 und FD22 zum Wildtyp erkennbar wären. Die drastische Erhöhung der Sensibilität gegenüber Alkylierungen könnte darauf hindeuten, dass auch während der BER, durch die Bildung von AP-Stellen, entweder die Replikation blockiert sein könnte oder durch die Endonukleasen Nth und Nei bzw. die Exonuklease III die Häufung von TSLs schließlich zu DSBs führen könnten und somit Substrate für die RR verursacht werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die DNA-Translokase RecG für das Entwinden verschiedenartig verzweigter DNA zuständig ist. Dabei spielt das multi-funktionelle Enzym nicht nur bei der HR eine wichtige Rolle. RecG ist an weiteren Prozessen wie der Initiation der Replikation beteiligt. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass in *C. glutamicum* beide Systeme (RuvABC und RecG) für eine effiziente DNA-Reparatur benötigt werden.

4.5 Funktion von RecJ und RecB

Bei RecJ aus *E. coli* handelt es sich um eine 5'-3'-Exonuklease. Während der HR degradiert dieses Enzym das 5'-Ende an einem DSB und ist somit am wichtigsten Prozess in dieser frühen Phase der RR beteiligt (Symington und Gautier 2011). RecJ kommt zum Einsatz, wenn die Reparatur über den RecFOR-Weg vonstatten geht. Gemeinsam mit RecQ und Einzelstrang-Bindeproteinen (SSB) initiiert RecJ den Abbau der 5'-Enden an DSBs (Courcelle und Hanawalt 1999; Han *et al.* 2006; Handa *et al.* 2009; Morimatsu und Kowalczykowski 2014). Der dabei entstehende einzelsträngige 3'-Überhang kann dann mittels RecA mit dem komplementären DNA-Strang gepaart werden und die HR erfolgen. Vorausgegangene Studien haben bereits

gezeigt, dass die gleichzeitige Deletion von RecJ und RecBCD die Rekombinationsfähigkeit der Zellen stark beeinflusst (Lovett und Clark 1984). Außerdem ist RecJ an der Reparatur von TSLs, der BER und der methylierungsabhängigen Reparatur von Basenfehlpaarungen beteiligt (Burdett *et al.* 2001; Dianov *et al.* 1994; Lovett und Kolodner 1989). Zusätzlich zeigt RecJ dRPase-Aktivität und ist in der Prozessierung von AP-Stellen involviert (Dianov *et al.* 1994). Es wurde auch gezeigt, dass RecJ nur in der Lage ist, einzelsträngige DNA in 5'-3'-Richtung abzubauen. Doppelsträngige DNA ohne Überhang und DNA mit 3'-Überhang dienen nicht als Substrat für dieses Enzym (Cheng *et al.* 2015; Han *et al.* 2006; Jiao *et al.* 2012). Dementsprechend wird, wie erwähnt, für den Abbau doppelsträngiger Enden in *E. coli* auch die 3'-5'-Helikase RecQ benötigt (Morimatsu und Kowalczykowski 2014).

Aufgrund dieser Eigenschaften wäre zu erwarten gewesen, dass die Deletion von RecJ eine deutliche Verschlechterung der Überlebensfähigkeit nach der Behandlung mit den verschiedenen Mutagenen mit sich bringt. Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 35 bis Abbildung 38). Während die Behandlung mit Mitomycin C und UV-Licht kaum einen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zum Wildtyp hatte, konnte nach der Zugabe von Zeocin sogar eine deutlich gesteigerte Toleranz bei der *recJ*-Mutante festgestellt werden. Lediglich die MNNG-Mutagenese machte deutlich, dass RecJ bei der Reparatur von Alkylierungen eine Rolle spielt. Aufgrund dieser überraschenden Ergebnisse, sollte die Funktion von RecJ nochmals genauer untersucht werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob RecJ aus *C. glutamicum* auch nur zum Abbau von DNA mit 5'-Überhang befähigt ist, oder vielleicht auch DNA mit 3'-Überhang oder ohne Überhang als Substrat nutzen kann. Dazu wurde unterschiedlich linearisierte Plasmid-DNA (pUC18) eingesetzt. Überraschenderweise wurde hierbei ersichtlich, dass RecJ die DNA in jedem Fall, also unabhängig von der Art des Endes, abbaute (Abbildung 41). Zum Vergleich wurde dieses Experiment noch mit RecJ_f aus *E. coli* (New England Biolabs) durchgeführt. Abbildung 42 zeigt, dass RecJ_f unter diesen Bedingungen keine DNA abbaute. Da dieses Enzym einen 5'-Überhang von mindestens 7 Basen benötigt und die Plasmid-DNA nach der Linearisierung mittels *Sma*I (→ kein Überhang), *Hind*III (→ 5'-Überhang) und *Sph*I (→ 3'-Überhang) keinen bzw. nur einen 4 Basen-Überhang besaß, war dieses Ergebnis zu erwarten. Um die Aktivität von RecJ aus *C. glutamicum* und RecJ_f aus *E. coli* zu vergleichen, musste also ein DNA-Fragment verwendet

werden, dass Überhänge von mindestens 7 Basen aufweist. Bei diesem Versuch konnte wieder bestätigt werden, dass RecJ aus *C. glutamicum* die DNA vollständig abbaute (Abbildung 43). Sowohl die DNA-Fragmente ohne überhängendes Ende, als auch die beiden DNA-Fragmente mit jeweils 10 Basen-Verlängerung am 3'- bzw. 5'-Ende, konnten nach der Inkubation mit RecJ nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem wurde ersichtlich, dass das kommerziell erworbene Enzym RecJ_f, wie erwartet, nur die DNA mit 5'-Überhang abbaute. Dass diese Unterschiede zwischen RecJ aus *C. glutamicum* und RecJ_f aus *E. coli* evtl. aus Verunreinigungen des aufgereinigten Proteins resultierten, konnte ausgeschlossen werden. Abbildung 44 zeigte deutlich, dass kein Abbau der DNA nach Inkubation des Proteinextraktes ohne RecJ stattgefunden hatte. Dies wiederum zeigt, dass RecJ aus *C. glutamicum* über ein breiteres Substratspektrum verfügt als RecJ_f aus *E. coli* und somit vermutlich auch auf vielfältigere Weise Einfluss auf die Reparatur nehmen kann.

Analog zur Untersuchung der Substratspezifität von RecJ wurde auch die Nukleaseaktivität von RecB untersucht. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass das Genom von *C. glutamicum* nur das Gen *recB* trägt, die Homologe zu *recC* und *recD* fehlen dem Bakterium (Resende *et al.* 2011). RecB ist Teil des Enzymkomplexes RecBCD, welcher für die Reparatur von DSBs zuständig ist. Der Komplex RecBC umfasst eine Helikase- und Nukleaseaktivität und bereitet, gemeinsam mit RecD, die DNA auf die HR über RecA vor. Alternativ dazu, wird die Vorbereitung der Reparatur mittels RecA von RecQ, RecJ und RecFOR übernommen. Da die Funktion von RecB bisher weitgehend nur als Untereinheit des Enzymkomplexes RecBCD bekannt ist, sollte die Aktivität dieses Proteins hier weiter untersucht werden.

In Abbildung 43 ist zu sehen, dass sich die Laufeigenschaft der DNA mit überhängenden Enden nach der Zugabe von RecB aus *C. glutamicum* ebenfalls veränderte. Ob es sich hierbei um DNA-Abbau oder evtl. eine reine Helikaseaktivität handelt, musste weiter geklärt werden. Um dies zu untersuchen, wurden als Substrat DNA-Fragmente eingesetzt, welche an einem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert wurden. Die Sequenzen der einzelnen Stränge wurden dabei so gewählt, dass nur ein Teil der beiden Einzelstränge komplementär zueinander war und nach der Hybridisierung eine Y-förmige Struktur entstand (Abbildung 45). Diese Fragmente sollten also einen optimalen Angriffspunkt für die evtl. vorhandene Helikaseaktivität von RecB darstellen. Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel wurde die DNA mittels Phosphoimagers detektiert. Die Ergebnisse (Abbildung 46) machten deutlich, dass

RecB aus *C. glutamicum* auch über eine Exonukleaseaktivität verfügt, die zum vollständigen Abbau der DNA führt. Da zuvor die Doppelstrang-DNA nicht abgebaut wurde und bei der Y-förmigen DNA der Doppelstrang-Bereich ebenfalls verschwunden war, kann man gleichzeitig eine Helikaseaktivität von RecB annehmen. Diese war vorher nicht sichtbar, da die Helikase eben diese Y-Struktur benötigt. Ebenso konnte hier die ATP-Abhängigkeit von RecB gezeigt werden, da ohne ATP keine Veränderung der Laufeigenschaften hervorgerufen wurde.

Es sollte ebenfalls geklärt werden, in welche Richtung der Abbau der DNA hier stattgefunden hat. Dabei wurden jeweils entweder 5'- oder 3'-Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese Markierung sollte den Abbau vom jeweiligen Ende her blockieren. Bei einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität sollte also der Strang resistent gegen den Abbau sein, der am 5'-Ende die Markierung trug. Eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität sollte durch die Markierung am 3'-Ende unterbunden werden (siehe Abbildung 47). Überraschenderweise stellte sich aber heraus, dass die Markierungen nicht vor dem Abbau schützten und Fragmente auftauchten, die deutlich kleiner waren. Der einzige Unterschied dabei war, dass die FITC-Markierung am einzelsträngigen 5'-Ende zu einem etwas größeren Abbauprodukt führte als die Markierung am einzelsträngigen 3'-Ende (Abbildung 49). Eine ähnliche Beobachtung wurde mit RecJ gemacht (Abbildung 48). Der Unterschied der Laufweiten dieser beiden DNA-Reste war im Fall von RecJ etwas größer als bei RecB. Dies könnte ein Hinweis auf die mögliche Funktionsweise des Enzyms und die Richtung des Abbaus sein.

Zusätzlich wurden neben den Y-Strukturen auch nochmals einfache dsDNA-Fragmente und auch ssDNA eingesetzt (Abbildung 50). Hier wurde ersichtlich, dass RecB eindeutig ssDNA für den Abbau benötigt (Abbildung 51 B). RecJ baute wieder sowohl die dsDNA ohne einzelsträngigen Bereich, als auch ssDNA ab (Abbildung 51 A). Auch hier entstanden nach dem Abbau wieder verschiedene Produkte mit unterschiedlichen Laufweiten. Die Fluoreszenz-Markierung am 5'-Ende führte zu einem Produkt mit kürzerer Laufweite als die Markierung am 3'-Ende.

Diese Ergebnisse und auch die Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen von RecJ aus *E. coli* lassen nun Schlüsse auf die genauere Funktionsweise dieses Enzyms aus *C. glutamicum* zu. Nimmt man an, dass RecJ aus *C. glutamicum* aufgrund der Homologie zu RecJ aus *E. coli* tatsächlich in 5'-3'-Richtung DNA abbaut und auch die DNA am 5'-Ende durch den FITC-

Farbstoff vor dem Abbau geschützt ist, dann sollte RecJ zusätzlich über eine Endonukleaseaktivität verfügen. In der folgenden Abbildung ist die mögliche Funktionsweise von RecJ schematisch dargestellt.

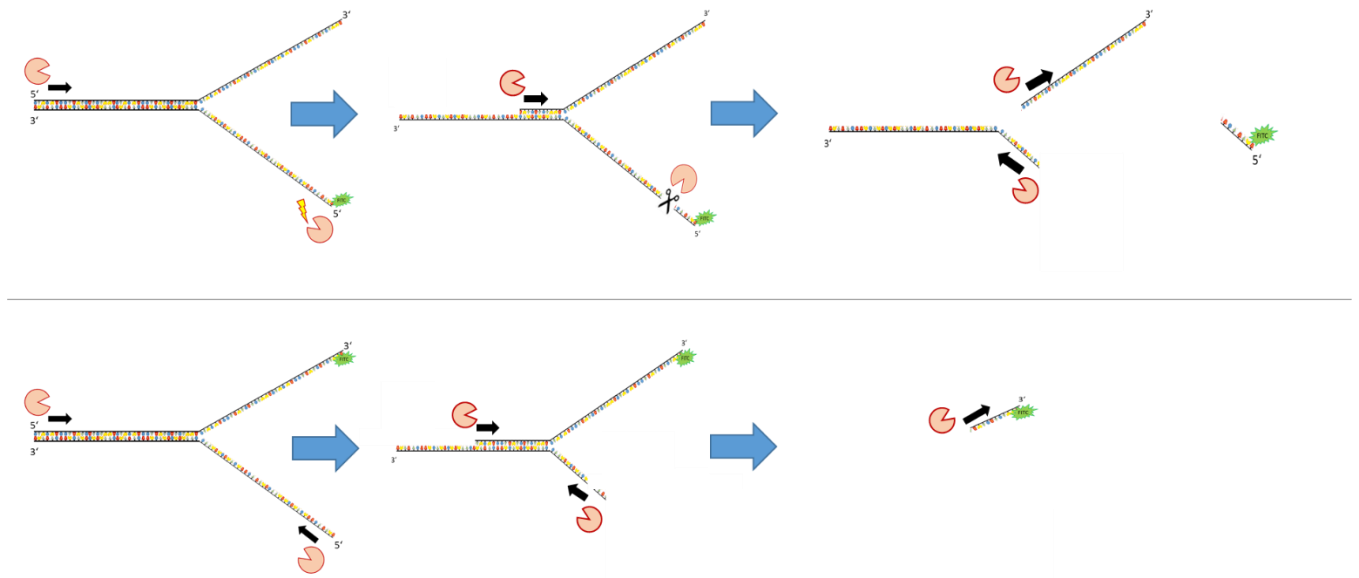


Abbildung 52: Vermutete Funktionsweise von RecJ

Im oberen Abschnitt des Funktionsschemas ist der Abbau der DNA mit FITC-Markierung am 5'-Ende im einzelsträngigen Bereich dargestellt. Der Abbau vom einzelsträngigen 5'-Ende wird zunächst durch die Fluoreszenzmarkierung gehemmt. Vom doppelsträngigen Ende her findet der Abbau in 5'-3'-Richtung ungehindert statt. Die integrierte Endonukleaseaktivität von RecJ führt zu einem Schnitt des markierten Stranges, so dass anschließend auch hier in 5'-3'-Richtung abgebaut werden kann.

Im Falle der Markierung des 3'-Endes (unterer Bildabschnitt) kann der Abbau von beiden 5'-Enden stattfinden.

Der Abbau zum markierten Ende (3'-Ende) hin resultiert dabei in einem kleineren DNA-Fragment als das Endprodukt mit 5'-Markierung nach dem Schnitt durch die Endonukleaseaktivität. Diese kann vermutlich nur in einem gewissen Abstand zum Strangende stattfinden.

Die Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen von RecJ in Kombination mit den Ergebnissen aus den Mutageneseversuchen lassen den Schluss zu, dass RecJ als Exo- bzw. Endonuklease ein Substrat nicht nur endständig (in 5'-3'-Richtung) spalten kann. Die überraschende Verbesserung der Überlebensfähigkeit der Zellen ohne *recJ* nach der Zugabe von Zeocin könnte dadurch bedingt sein, dass RecJ auch zur Spaltung der Phosphodiesterbindung innerhalb des 3'-Überhangs, welcher zum Beladen mit RecA benötigt wird, befähigt ist. Somit würde RecJ die HR negativ beeinflussen und sein Fehlen hätte einen positiven Effekt.

Die Funktion von RecB ohne RecC und RecD ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der Homologie mit RecB aus *E. coli* und den vorliegenden Ergebnissen wäre es naheliegend, dass es sich um eine ATP-abhängige Helikase und eine Nuklease handelt. In *E. coli* wurde diese Funktionsweise bereits untersucht (Yu et al. 1998). Hier wurde die Helikaseaktivität dem N-terminalen Ende des Enzyms zugesprochen. Am C-Terminus befindet sich offenbar die Einheit, der Nukleaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Die Nuklease-Untereinheit des Enzyms ist dabei über ein flexibles Segment mit der Helikase-Untereinheit verbunden. Es wurde auch gezeigt, dass die Inaktivierung von RecB innerhalb des Enzymkomplexes RecBCD zu einer Inaktivierung der Nukleaseaktivität des gesamten Komplexes führte. So dass davon ausgegangen wird, dass RecB sowohl den Abbau des 3'- Endes als auch des 5'-Endes katalysiert. Die 3'-5'-Richtung der Helikaseaktivität bestimmt dabei allerdings welcher Strang bevorzugt abgebaut wird. Sobald die räumliche Nähe beider Stränge nach dem Aufschmelzen durch die Helikase nicht mehr gegeben ist, kann die Nuklease-Untereinheit den 5'-Strang nicht mehr erreichen. Erst nachdem RecB den Doppelstrang vollständig aufgeschmolzen hat, kann das Enzym vom anderen 3'-Ende her den Einzelstrang abbauen.

Die sich daraus ergebende mögliche Funktionsweise von RecB ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 53) schematisch dargestellt.

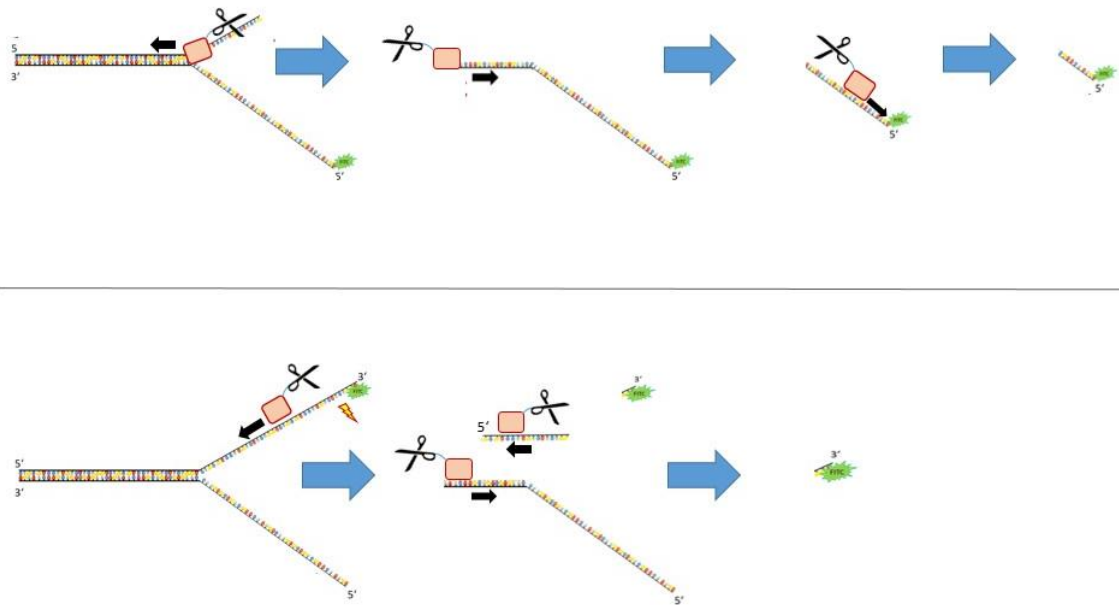


Abbildung 53: Mögliche Funktionsweise von RecB

Der obere Bildabschnitt zeigt den Abbau von DNA durch RecB. Hier ist das 5'-Ende der Y-förmigen DNA im einzelsträngigen Bereich mit FITC markiert. Der Abbau kann durch RecB nur im einzelsträngigen Bereich stattfinden. Allerdings erfolgt dieser bevorzugt in 3'-5'-Richtung. Somit kann RecB hier den oberen Strang vom 3'-Ende her abbauen. Durch die integrierte Helikaseaktivität kann RecB nach dem Aufschmelzen des Doppelstrangs auch vom ursprünglich doppelsträngigen Ende her die DNA abbauen. Am 5'-Ende erfolgt der letzte Schnitt ein paar Nukleotide vor dem Strangende.

Der untere Bildabschnitt zeigt den Abbau von DNA mit Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende. Hier erfolgt der Abbau des unmarkierten Strangs erst wenn die Helikase die beiden Doppelstränge aufgeschmolzen hat. Am markierten Strang führt die Nuklease nach der Bindung von RecB über seine Helikase-Untereinheit einen Schnitt im Einzelstrang durch. Dieser findet dabei direkt hinter dem markierten Ende statt.

Wie in den *in vitro*-Untersuchungen ersichtlich wurde, scheint das Endprodukt mit der Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende etwas kleiner zu sein, als das übrig bleibende DNA-Fragment mit der Markierung am 5'-Ende. Da die DNA über die Helikase-Untereinheit von

RecB gebunden wird, muss diese zunächst über eine Furche der N-terminalen Untereinheit zum Nukleasezentrum geführt werden. Der Abbau durch die Nuklease kann also nicht bis zum letzten Nukleotid stattfinden, da die Bindung des Enzyms nach Erreichen des Strangendes nicht mehr gegeben ist. Somit bleibt bei Markierung des 5'-Endes ein größeres Endprodukt im Gel sichtbar.

4.6 Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit konnten Informationen über die Funktionen der verschiedenen Enzyme der DNA-Reparatur in *C. glutamicum* erhalten werden. Einige Ergebnisse bestätigten bereits vorhandenes Wissen aus anderen Organismen, wie *E. coli*. Andere wiederum waren überraschend und warfen Fragen auf.

Die folgende Tabelle fasst noch einmal die Ergebnisse aus den verschiedenen Mutagenesen zusammen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht der Mutagenese-Ergebnisse der Mutanten

grün: keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp erkennbar, **hellrot:** leichte Reduzierung der Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp, **rot:** deutlich verringerte Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp, **blau:** verbesserte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp

REPARATURWEG	GEN	UV-LICHT	ZEOCIN	MMC	MNNG
DIREKTE REPARATUR	<i>ogt</i>				
	<i>alkB</i>				
BASENEXZISIONS-REPARATUR	<i>ung</i>				
	<i>alkA</i>				
	<i>tagI</i>				
	<i>alkA/tagI</i>				
	<i>mutY</i>				
	<i>alkA/tagI/mutY</i>				
	<i>mutM</i>				
	<i>nei</i>				
	<i>nth</i>				
	<i>nei/nth</i>				
	<i>xth</i>				

REPARATURWEG	GEN	UV-LICHT	ZEOCIN	MMC	MNNG
NUKLEOTIDEXZISIONS-REPARATUR	<i>uvrA</i>	↓	↓	↓	↑
	<i>uvrD</i>	↓	↓	↓	↓
REKOMBINATIONS-REPARATUR	<i>recA</i>	↓	↓	↓	↓
	<i>recB</i>	↔	↓	↓	↓
	<i>adnAB</i>	↓	↓	↓	↓
	<i>recB/adnAB</i>	↓	↓	↓	↓
	<i>recO</i>	↓	↓	↓	↓
	<i>ruvB</i>	↓	↓	↓	↓
	<i>recG</i>	↔	↓	↓	↓
	<i>recJ</i>	↔	↑	↓	↓

Die Enzyme der verschiedenen Reparaturwege zeigten, je nach Mutagen, verschiedenartige Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Nach der Behandlung mit MNNG nahm die Überlebensfähigkeit der *ogt*-Mutante, wie erwartet, drastisch ab. Hier zeigte sich eindeutig, dass Alkylierungen durch die S_N1 -spezifische Reaktion mittels Ogt wieder entfernt werden können. Die Beteiligung der Demethylase AlkB bei der Reparatur MNNG-induzierter Schäden konnte nicht nachgewiesen werden. Hier wäre noch interessant, die Überlebensraten dieser Mutante nach der Behandlung mit EMS (Ethylmethansulfonat) zu bestimmen, da vermutlich nur Alkylierungen, die in einer S_N2 -spezifischen Reaktion entstanden sind, von AlkB behoben werden können.

Außerdem könnte noch der Einfluss eines weiteren Enzyms aus der DR, der Methyltransferase Ada, untersucht werden. Auch die Herstellung einer Doppelmutante mit den Deletionen von *ogt* und *ada* könnte weitere Erkenntnisse über die Prävention und Reversion in *C. glutamicum* liefern.

Die Deletionen der BER haben gezeigt, dass die meisten Enzyme dieses Reparaturweges, wie erwartet, nur bei Alkylierungen (wie durch MNNG) eine essentielle Rolle spielen. Die Beteiligung der bifunktionalen Glykosylasen Nei und Nth bei der Reparatur von Schäden, die durch MMC verursacht wurden, war ebenfalls nicht überraschend.

Waren *uvrA* bzw. *uvrD* deletiert, so hatte dies deutliche Auswirkungen auf das Überleben der Zellen nach der Behandlung mit den verschiedenen Mutagenen. Die verbesserte Überlebensfähigkeit der Zellen in Gegenwart von MNNG nach der Deletion von *uvrA* war verwunderlich. Hier sollten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So könnten Mehrfachmutationen mit Genen innerhalb der NER (z.B. *uvrD*) oder aber auch aus der BER weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel dieser beiden Reparaturwege und die Rolle von *uvrA* liefern. Dass auch die Behandlung mit Zeocin Auswirkungen auf die Überlebensraten der Mutanten aus der NER hatten, war so ebenfalls nicht zu erwarten. Durch die gleichzeitige Deletion von Genen aus der NER und der RR könnte dies genauer untersucht werden. Vermutlich wären diese Mutationen allerdings lethal.

Die Untersuchung der RR in *C. glutamicum* machte deutlich, welchen hohen Stellenwert dieser Reparaturweg hat. Nicht nur im Fall der Zeocin-Mutagenese, sondern auch die Behandlung mit UV-Licht, MMC und MNNG führte zu teilweise deutlich geringeren Überlebensraten.

Neben der Herstellung weiterer Mehrfachmutanten innerhalb der einzelnen Reparaturwege wären auch noch gleichzeitige Deletionen von Genen aus verschiedenen Reparatursystemen zur genaueren Untersuchung der DNA-Reparatur von *C. glutamicum* interessant. Hierbei könnten detailliertere Aussagen über das Zusammenspiel einzelner Reparaturwege gemacht werden. Außerdem könnten zukünftig die bereits erhaltenen Deletionsstämme mittels weiterer Mutagene genauer charakterisiert werden. So könnten beispielsweise ionisierende Strahlung oder EMS (führt zu S_N2-spezifischen Alkylierungen) eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Deletionsmutanten von *recB* und *recJ* machten eine Untersuchung der genauen Funktionsweise dieser beiden Enzyme interessant. Hierbei zeigte sich zum einen, dass RecJ aus *C. glutamicum* in der Lage ist sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA abzubauen. Geht man davon aus, dass der Abbau durch RecJ aus *C. glutamicum* in 5'-3'-Richtung stattfindet, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass RecJ auch über eine integrierte Endonukleaseaktivität verfügen könnte. Die Untersuchung der Enzymaktivität von RecB aus *C. glutamicum* hat ergeben, dass dieses Enzym nicht in der Lage ist doppelsträngige DNA abzubauen. Die ebenfalls vorliegende Helikaseaktivität dieses Enzyms wird also benötigt um dsDNA aufzuspalten und anschließend die Einzelstränge abzubauen.

Um die vorliegenden Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zu untermauern, wären zusätzliche Experimente zur Enzymkinetik interessant. Sie könnten weitere Erkenntnisse über die Aktivitätsrichtung der beiden Nukleasen liefern.

Insgesamt lieferte diese Arbeit umfassende Erkenntnisse über die DNA-Reparatur in *C. glutamicum*. Die erhaltene Stammsammlung dient nun als Grundlage für weitere vertiefte Untersuchungen.

5 Literaturverzeichnis

- Abe, S.; Takayama, K.-I.; Kinoshita, S. (1967): Taxonomical Studies on Glutamic Acid-Producing Bacteria. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 13 (3), S. 279–301.
- Alonso, J. C.; Stiege, A. C.; Dobrinski, B.; Lurz, R. (1993): Purification and properties of the RecR protein from *Bacillus subtilis* 168. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (2), S. 1424–1429.
- Ames, B. N.; Gold, L. S. (1991): Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. In: *Mutation research* 250 (1-2), S. 3–16.
- Amundsen, Susan K.; Smith, Gerald R. (2003): Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. In: *Cell* 112 (6), S. 741–744.
- Anderson, D. G.; Kowalczykowski, S. C. (1997): The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner. In: *Cell* 90 (1), S. 77–86.
- Asahara, Hitomi; Wistort, Peter M.; Bank, Janet F.; Bakerian, Ronald H.; Cunningham, Richard P. (1989): Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned nth gene. In: *Biochemistry* 28 (10), S. 4444–4449. DOI: 10.1021/bi00436a048.
- Au, K. G.; Cabrera, M.; Miller, J. H.; Modrich, P. (1988): *Escherichia coli* mutY gene product is required for specific A-G---C.G mismatch correction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (23), S. 9163–9166.
- Bailly, V.; Verly, W. G.; O'Connor, T.; Laval, J. (1989): Mechanism of DNA strand nicking atapurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. In: *Biochem. J.* 262 (2), S. 581–589. DOI: 10.1042/bj2620581.
- Ban, C.; Yang, W. (1998): Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. In: *The EMBO journal* 17 (5), S. 1526–1534. DOI: 10.1093/emboj/17.5.1526.
- Begley, Thomas J.; Samson, Leona D. (2003): AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. In: *Trends in Biochemical Sciences* 28 (1), S. 2–5.

- Bennett, Richard J.; Dunderdale, Hazel J.; West, Stephen C. (1993): Resolution of holliday junctions by RuvC resolvase: Cleavage specificity and DNA distortion. In: *Cell* 74 (6), S. 1021–1031. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90724-5.
- Bernstein, H.; Byerly, H. C.; Hopf, F. A.; Michod, R. E. (1985): Genetic damage, mutation, and the evolution of sex. In: *Science (New York, N.Y.)* 229 (4719), S. 1277–1281.
- Bianco, Piero R. (2015): I came to a fork in the DNA and there was RecG. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 117 (2–3), S. 166–173. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.01.001.
- Bizanek, R.; McGuinness, B. F.; Nakanishi, K.; Tomasz, M. (1992): Isolation and structure of an intrastrand cross-link adduct of mitomycin C and DNA. In: *Biochemistry* 31 (12), S. 3084–3091.
- Bjelland, S.; Bjoras, M.; Seeberg, E. (1993): Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Research* 21 (9), S. 2045–2049.
- Bjelland, S.; Seeberg, E. (1987): Purification and characterization of 3-methyladenine DNA glycosylase I from *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Research* 15 (7), S. 2787–2801.
- Bjelland, Svein; Seeberg, Erling (2003): Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. In: *Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair* 531 (1–2), S. 37–80. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002.
- Boiteux, S.; Huisman, O. (1989): Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) mutant of *Escherichia coli* K12. In: *Molecular & general genetics : MGG* 215 (2), S. 300–305.
- Boiteux, Serge; Gajewski, Ewa; Laval, Jacques; Dizdaroglu, Miral (1992): Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. In: *Biochemistry* 31 (1), S. 106–110. DOI: 10.1021/bi00116a016.
- Boiteux, Serge; Guillet, Marie (2004): Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *DNA Repair* 3 (1), S. 1–12.

Borowy-Borowski, H.; Lipman, R.; Chowdary, D.; Tomasz, M. (1990): Duplex oligodeoxyribonucleotides cross-linked by mitomycin C at a single site: synthesis, properties, and cross-link reversibility. In: *Biochemistry* 29 (12), S. 2992–2999.

Boshoff, Helena I.M.; Reed, Michael B.; Barry, Clifton E.; Mizrahi, Valerie (2003): DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Cell* 113 (2), S. 183–193. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00270-8.

Bradford, Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Breen, A. P.; Murphy, J. A. (1995): Reactions of oxyl radicals with DNA. In: *Free radical biology & medicine* 18 (6), S. 1033–1077.

Breimer, L. H.; Lindahl, T. (1984): DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 259 (9), S. 5543–5548.

Briggs, Geoffrey S.; Mahdi, Akeel A.; Weller, Geoffrey R.; Wen, Qin; Lloyd, Robert G. (2004): Interplay between DNA replication, recombination and repair based on the structure of RecG helicase. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359 (1441), S. 49–59. DOI: 10.1098/rstb.2003.1364.

Bröer, S.; Krämer, R. (1990): Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. In: *J. Bacteriol.* 172 (12), S. 7241–7248. DOI: 10.1128/jb.172.12.7241-7248.1990.

Burdett, V.; Baitinger, C.; Viswanathan, M.; Lovett, S. T.; Modrich, P. (2001): In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12), S. 6765–6770. DOI: 10.1073/pnas.121183298.

Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S. (1999): Hydroxyl radicals and DNA base damage. In: *Mutation research* 424 (1-2), S. 9–21.

Cadet, Jean; Sage, Evelyne; Douki, Thierry (2005): Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. In: *Mutation research* 571 (1-2), S. 3–17. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012.

Campbell, A. (1984): Types of recombination: common problems and common strategies. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 49, S. 839–844.

Capaldo, F. N.; Ramsey, G.; Barbour, S. D. (1974): Analysis of the growth of recombination-deficient strains of *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 118 (1), S. 242–249.

Carrasco, Begona; Yadav, Tribhuwan; Serrano, Ester; Alonso, Juan C. (2015): *Bacillus subtilis* RecO and SsbA are crucial for RecA-mediated recombinational DNA repair. In: *Nucleic Acids Research* 43 (12), S. 5984–5997. DOI: 10.1093/nar/gkv545.

Chatgililoglu, C.; O'Neill, P. (2001): Free radicals associated with DNA damage. In: *Experimental gerontology* 36 (9), S. 1459–1471.

Chedin, Frederic; Handa, Naofumi; Dillingham, Mark S.; Kowalczykowski, Stephen C. (2006): The AddAB helicase/nuclease forms a stable complex with its cognate chi sequence during translocation. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (27), S. 18610–18617. DOI: 10.1074/jbc.M600882200.

Chedin, Frederic; Kowalczykowski, Stephen C. (2002): A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria. Insights into the initiation of DNA recombination. In: *Mol Microbiol* 43 (4), S. 823–834. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02785.x.

Chedin, Frederic; Noirot, Philippe; Biaudet, Veronique; Ehrlich, S. Dusko (1998): A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. In: *Mol Microbiol* 29 (6), S. 1369–1377. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01018.x.

Chen, Fangyi; Tang, Qi; Bian, Ke; Humulock, Zachary T.; Yang, Xuedong; Jost, Marco et al. (2016): Adaptive Response Enzyme AlkB Preferentially Repairs 1-Methylguanine and 3-Methylthymine Adducts in Double-Stranded DNA. In: *Chemical research in toxicology* 29 (4), S. 687–693. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00522.

Cheng, Kaiying; Zhao, Ye; Chen, Xuanyi; Li, Tao; Wang, Liangyan; Xu, Hong et al. (2015): A Novel C-Terminal Domain of RecJ is Critical for Interaction with HerA in *Deinococcus radiodurans*. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 1302. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01302.

Cheng, S.; van Houten, B.; Gamper, H. B.; Sancar, A.; Hearst, J. E. (1988): Use of psoralen-modified oligonucleotides to trap three-stranded RecA-DNA complexes and repair of these cross-linked complexes by ABC excinuclease. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (29), S. 15110–15117.

Chetsanga, Christopher J.; Frenette, Gary P. (1983): Excision of aflatoxin B 1 -imidazole ring opened guanine adducts from DNA by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. In: *Carcinogenesis* 4 (8), S. 997–1000. DOI: 10.1093/carcin/4.8.997.

Chetsanga, Christopher J.; Lindahl, Thomas (1979): Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. In: *Nucl Acids Res* 6 (11), S. 3673–3684. DOI: 10.1093/nar/6.11.3673.

Chetsanga, Christopher J.; Polidori, Gregg; Mainwaring, Mark (1982): Analysis and Excision of Ring-opened Phosphoramidate Mustard-Deoxyguanine Adducts in DNA. In: *Cancer research* 42 (7), S. 2616–2621. Online verfügbar unter <http://cancerres.aacrjournals.org/content/42/7/2616>.

Chung, C. T.; Niemela, S. L.; Miller, R. H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7), S. 2172–2175.

Clark, J. M.; Beardsley, G. P. (1986): Thymine glycol lesions terminate chain elongation by DNA polymerase I in vitro. In: *Nucleic Acids Research* 14 (2), S. 737–749.

Clark, J. M.; Beardsley, G. P. (1987): Functional effects of cis-thymine glycol lesions on DNA synthesis in vitro. In: *Biochemistry* 26 (17), S. 5398–5403.

Cole, R. S. (1971): Properties of F' factor deoxyribonucleic acid transferred from ultraviolet-irradiated donors: photoreactivation in the recipient and the influence of recA, recB, recC, and uvr genes. In: *Journal of Bacteriology* 106 (1), S. 143–149.

Compton, Steve J.; Jones, Clive G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. In: *Analytical Biochemistry* 151 (2), S. 369–374. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90190-3.

Connolly, B.; Parsons, C. A.; Benson, F. E.; Dunderdale, H. J.; Sharples, G. J.; Lloyd, R. G.; West, S. C. (1991): Resolution of Holliday junctions in vitro requires the *Escherichia coli* *ruvC* gene product. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14), S. 6063–6067.

Courcelle, J.; Ganesan, A. K.; Hanawalt, P. C. (2001): Therefore, what are recombination proteins there for? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23 (5), S. 463–470. DOI: 10.1002/bies.1065.

Courcelle, J.; Hanawalt, P. C. (1999): RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. In: *Molecular and General Genetics MGG* 262 (3), S. 543–551. DOI: 10.1007/s004380051116.

Cox, M. M.; Lehman, I. R. (1987): Enzymes of general recombination. In: *Annual review of biochemistry* 56, S. 229–262. DOI: 10.1146/annurev.bi.56.070187.001305.

Dalhus, Björn; Laerdahl, Jon K.; Backe, Paul H.; Björnås, Magnar (2009): DNA base repair “ α ” recognition and initiation of catalysis. In: *FEMS Microbiology Reviews* 33 (6), S. 1044–1078. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x.

Dao, V.; Modrich, P. (1998): Mismatch-, MutS-, MutL-, and Helicase II-dependent Unwinding from the Single-strand Break of an Incised Heteroduplex. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (15), S. 9202–9207. DOI: 10.1074/jbc.273.15.9202.

Das, Aditi; Wiederhold, Lee; Leppard, John B.; Kedar, Padmini; Prasad, Rajendra; Wang, Huxian et al. (2006): NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA. Evidence for a repair complex in human cells. In: *DNA Repair* 5 (12), S. 1439–1448. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.07.003.

David, Sheila S.; O'Shea, Valerie L.; Kundu, Sucharita (2007): Base-excision repair of oxidative DNA damage. In: *Nature* 447 (7147), S. 941–950. DOI: 10.1038/nature05978.

Demple, B.; Johnson, A.; Fung, D. (1986): Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (20), S. 7731–7735.

Dewhare, Shivendra Singh; Umesh, T. G.; Muniyappa, K. (2015): Molecular and Functional Characterization of RecD, a Novel Member of the SF1 Family of Helicases, from

Mycobacterium tuberculosis. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (19), S. 11948–11968. DOI: 10.1074/jbc.M114.619395.

Dianov, G.; Lindahl, T. (1994): Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. In: *Current biology : CB* 4 (12), S. 1069–1076.

Dianov, G.; Price, A.; Lindahl, T. (1992): Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. In: *Molecular and cellular biology* 12 (4), S. 1605–1612.

Dianov, G.; Sedgwick, B.; Daly, G.; Olsson, M.; Lovett, S.; Lindahl, T. (1994): Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. In: *Nucleic Acids Research* 22 (6), S. 993–998.

Dillingham, Mark S.; Kowalczykowski, Stephen C. (2008): RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 72 (4), 642-71, Table of Contents. DOI: 10.1128/MMBR.00020-08.

Dinglay, Suneet; Gold, Barry; Sedgwick, Barbara (1998): Repair in *Escherichia coli* alkB mutants of abasic sites and 3-methyladenine residues in DNA. In: *Mutation Research/DNA Repair* 407 (2), S. 109–116. DOI: 10.1016/S0921-8777(97)00065-7.

Dixon, D. A.; Kowalczykowski, S. C. (1991): Homologous pairing in vitro stimulated by the recombination hotspot, Chi. In: *Cell* 66 (2), S. 361–371.

Dixon, D. A.; Kowalczykowski, S. C. (1993): The recombination hotspot chi is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. In: *Cell* 73 (1), S. 87–96.

Dunderdale, H. J.; Benson, F. E.; Parsons, C. A.; Sharples, G. J.; Lloyd, R. G.; West, S. C. (1991): Formation and resolution of recombination intermediates by *E. coli* RecA and RuvC proteins. In: *Nature* 354 (6354), S. 506–510. DOI: 10.1038/354506a0.

Dutreix, M.; Moreau, P. L.; Bailone, A.; Galibert, F.; Battista, J. R.; Walker, G. C.; Devoret, R. (1989): New recA mutations that dissociate the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role for RecA protein in UV mutagenesis. In: *Journal of Bacteriology* 171 (5), S. 2415–2423.

Eggeling, Lothar; Bott, Michael (2015): A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 99 (8), S. 3387–3394. DOI: 10.1007/s00253-015-6508-2.

Eisen, J. A.; Hanawalt, P. C. (1999): A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. In: *Mutation research* 435 (3), S. 171–213.

Falnes, Pal O.; Johansen, Rune F.; Seeberg, Erling (2002): AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. In: *Nature* 419 (6903), S. 178–182. DOI: 10.1038/nature01048.

Fernandez, S.; Ayora, S.; Alonso, J. C. (2000): *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. In: *Research in microbiology* 151 (6), S. 481–486.

Friedberg, Errol C. (2006): DNA repair and mutagenesis. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press.

Fromme, J. Christopher; Banerjee, Anirban; Verdine, Gregory L. (2004): DNA glycosylase recognition and catalysis. In: *Current Opinion in Structural Biology* 14 (1), S. 43–49. DOI: 10.1016/j.sbi.2004.01.003.

Fukuoh, A.; Iwasaki, H.; Ishioka, K.; Shinagawa, H. (1997): ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by *Escherichia coli* RecG protein, a Holliday junction-specific helicase. In: *The EMBO journal* 16 (1), S. 203–209. DOI: 10.1093/emboj/16.1.203.

Goodhead, D. T. (1994): Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. In: *International journal of radiation biology* 65 (1), S. 7–17.

Gordon, L. K.; Haseltine, W. A. (1980): Comparison of the cleavage of pyrimidine dimers by the bacteriophage T4 and *Micrococcus luteus* UV-specific endonucleases. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (24), S. 12047–12050.

Gorecka, Karolina M.; Komorowska, Weronika; Nowotny, Marcin (2013): Crystal structure of RuvC resolvase in complex with Holliday junction substrate. In: *Nucleic Acids Research* 41 (21), S. 9945–9955. DOI: 10.1093/nar/gkt769.

Grafstrom, R. H.; Park, L.; Grossman, L. (1982): Enzymatic repair of pyrimidine dimer-containing DNA. A 5' dimer DNA glycosylase: 3'-apyrimidinic endonuclease mechanism from *Micrococcus luteus*. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (22), S. 13465–13474.

Graves, R. J.; Felzenszwalb, I.; Laval, J.; O'Connor, T. R. (1992): Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (20), S. 14429–14435.

Grundmann, L. (2012): Untersuchung der DNA-Reparaturwege in *Streptomyces lividans* TK64 anhand von Deletionsmutanten. Dissertation, 2012. Online verfügbar unter <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2013/8098/>.

Guarne, Alba; Ramon-Maiques, Santiago; Wolff, Erika M.; Ghirlando, Rodolfo; Hu, Xiaojian; Miller, Jeffrey H.; Yang, Wei (2004): Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. In: *The EMBO journal* 23 (21), S. 4134–4145. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600412.

Guillet, Marie; Boiteux, Serge (2002): Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The EMBO journal* 21 (11), S. 2833–2841. DOI: 10.1093/emboj/21.11.2833.

Gupta, Richa; Barkan, Daniel; Redelman-Sidi, Gil; Shuman, Stewart; Glickman, Michael S. (2011): Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways. In: *Molecular microbiology* 79 (2), S. 316–330. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07463.x.

Gupta, Richa; Ryzhikov, Mikhail; Koroleva, Olga; Unciuleac, Mihaela; Shuman, Stewart; Korolev, Sergey; Glickman, Michael S. (2013): A dual role for mycobacterial RecO in RecA-dependent homologous recombination and RecA-independent single-strand annealing. In: *Nucleic Acids Research* 41 (4), S. 2284–2295. DOI: 10.1093/nar/gks1298.

Gupta, Richa; Shuman, Stewart; Glickman, Michael S. (2015): RecF and RecR Play Critical Roles in the Homologous Recombination and Single-Strand Annealing Pathways of Mycobacteria. In: *Journal of Bacteriology* 197 (19), S. 3121–3132. DOI: 10.1128/JB.00290-15.

Gupta, Sankalp; Yeeles, Joseph T. P.; Marians, Kenneth J. (2014): Regression of replication forks stalled by leading-strand template damage: I. Both RecG and RuvAB catalyze regression, but RuvC cleaves the holliday junctions formed by RecG preferentially. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (41), S. 28376–28387. DOI: 10.1074/jbc.M114.587881.

- Halliwell, B.; Aruoma, O. I. (1991): DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. In: *FEBS letters* 281 (1-2), S. 9–19.
- Han, Eugene S.; Cooper, Deani L.; Persky, Nicole S.; Sutera, Vincent A., JR; Whitaker, Richard D.; Montello, Melissa L.; Lovett, Susan T. (2006): RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. In: *Nucleic Acids Research* 34 (4), S. 1084–1091. DOI: 10.1093/nar/gkj503.
- Handa, Naofumi; Morimatsu, Katsumi; Lovett, Susan T.; Kowalczykowski, Stephen C. (2009): Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. In: *Genes & development* 23 (10), S. 1234–1245. DOI: 10.1101/gad.1780709.
- Hargreaves, David; Rice, David W.; Sedelnikova, Svetlana E.; Artymiuk, Peter J.; Lloyd, Robert G.; Rafferty, John B. (1998): Crystal structure of *E. coli* RuvA with bound DNA Holliday junction at 6 Å resolution. In: *Nat Struct Mol Biol* 5 (6), S. 441–446. DOI: 10.1038/nsb0698-441.
- Harmon, F. G.; Kowalczykowski, S. C. (1998): RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. In: *Genes & development* 12 (8), S. 1134–1144.
- Hatahet, Z.; Kow, Y. W.; Purmal, A. A.; Cunningham, R. P.; Wallace, S. S. (1994): New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. In: *J. Biol. Chem.* 269 (29), S. 18814–18820. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/269/29/18814.full.pdf>.
- Hess, M. T.; Schwitter, U.; Petretta, M.; Giese, B.; Naegeli, H. (1997): Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13), S. 6664–6669.
- Hoeijmakers, J. H. (2001): DNA repair mechanisms. In: *Maturitas* 38 (1), S. 17.
- Hoffmann, M. E.; Meneghini, R. (1979): Action of hydrogen peroxide on human fibroblast in culture. In: *Photochemistry and photobiology* 30 (1), S. 151–155.

- Honda, Masayoshi; Inoue, Jin; Yoshimasu, Masatoshi; Ito, Yutaka; Shibata, Takehiko; Mikawa, Tsutomu (2006): Identification of the RecR Toprim domain as the binding site for both RecF and RecO. A role of RecR in RecFOR assembly at double-stranded DNA-single-stranded DNA junctions. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (27), S. 18549–18559. DOI: 10.1074/jbc.M512658200.
- Horii, Z.; Clark, A. J. (1973): Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. In: *Journal of Molecular Biology* 80 (2), S. 327–344.
- Howard-Flanders, P.; Boyce, R. P.; Theriot, L. (1966): Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. In: *Genetics* 53 (6), S. 1119–1136.
- Howard-Flanders, P.; Theriot, L. (1966): Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination. In: *Genetics* 53 (6), S. 1137–1150.
- Howard-Flanders, P.; West, S. C.; Rusche, J. R.; Egelman, E. H. (1984): Molecular mechanisms of general genetic recombination: the DNA-binding sites of RecA protein. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 49, S. 571–580.
- Husain, I.; van Houten, B.; Thomas, D. C.; Abdel-Monem, M.; Sancar, A. (1985): Effect of DNA polymerase I and DNA helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (20), S. 6774–6778.
- Ikeda, K. (2002): New Seasonings. In: *Chemical Senses* 27 (9), S. 847–849. DOI: 10.1093/chemse/27.9.847.
- Imlay, J. A.; Linn, S. (1988): DNA damage and oxygen radical toxicity. In: *Science (New York, N.Y.)* 240 (4857), S. 1302–1309.
- Iwasaki, H.; Takahagi, M.; Nakata, A.; Shinagawa, H. (1992): *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins specifically interact with Holliday junctions and promote branch migration. In: *Genes & development* 6 (11), S. 2214–2220. DOI: 10.1101/gad.6.11.2214.
- Jäger, W.; Schäfer, A.; Pühler, A.; Labes, G. and Wohlleben, W. (1992): Expression of the *Bacillus subtilis* sacB Gene Leads to Sucrose Sensitivity in the Gram-Positive Bacterium

Corynebacterium glutamicum but not in *Streptomyces lividans*. In: *Journal of Bacteriology*, S. 5462–5465.

Jeske, Marcel; Altenbuchner, Josef (2010): The *Escherichia coli* rhamnose promoter rhaP(BAD) is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. In: *Applied microbiology and biotechnology* 85 (6), S. 1923–1933. DOI: 10.1007/s00253-009-2245-8.

Jiao, Jiandong; Wang, Liangyan; Xia, Wenrong; Li, Mingfeng; Sun, Hongxing; Xu, Guangzhi et al. (2012): Function and biochemical characterization of RecJ in *Deinococcus radiodurans*. In: *DNA Repair* 11 (4), S. 349–356. DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.11.008.

Junop, Murray S.; Obmolova, Galina; Rausch, Kelly; Hsieh, Peggy; Yang, Wei (2001): Composite Active Site of an ABC ATPase. In: *Molecular cell* 7 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00149-6.

Kalinowski, Jörn; Bathe, Brigitte; Bartels, Daniela; Bischoff, Nicole; Bott, Michael; Burkovski, Andreas et al. (2003): The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. In: *A New Era in Corynebacterium glutamicum Biotechnology* 104 (1–3), S. 5–25. DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00154-8.

Karran, Peter; Hjelmgren, Thomas; LINDAHL, TOMAS (1982): Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. In: *Nature* 296 (5859), S. 770–773. DOI: 10.1038/296770a0.

Kasai, H.; Nishimura, S. (1984): Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. In: *Gan* 75 (7), S. 565–566.

Kataoka, H.; Yamamoto, Y.; Sekiguchi, M. (1983): A new gene (alkB) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate. In: *Journal of Bacteriology* 153 (3), S. 1301–1307.

Katcher, Harold L.; Wallace, Susan S. (1983): Characterization of the *Escherichia coli* x-ray endonuclease, endonuclease III. In: *Biochemistry* 22 (17), S. 4071–4081. DOI: 10.1021/bi00286a013.

- Kautzmann, Fabiola; Altenbuchner, Josef (2017): Inactivation of genes involved in base excision repair of *Corynebacterium glutamicum* and survival of the mutants in presence of various mutagens. In: *Archives of microbiology*. DOI: 10.1007/s00203-017-1377-y.
- Kenyon, C. J.; Walker, G. C. (1981): Expression of the *E. coli* *uvrA* gene is inducible. In: *Nature* 289 (5800), S. 808–810.
- Khanna, K. K.; Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. In: *Nature genetics* 27 (3), S. 247–254. DOI: 10.1038/85798.
- Kinoshita, S.; Udaka, S.; Shimon, M. (1957): Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. In: *J. Gen. Applied Microbiol.* (3), S. 193–205.
- Kirchner, Oliver; Tauch, Andreas (2003): Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of Biotechnology* 104 (1-3), S. 287–299. DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00148-2.
- Kohalmi, S. E.; Roche, H. M.; Kunz, B. A. (1993): Elevated intracellular dCTP levels reduce the induction of GC→AT transitions in yeast by ethyl methanesulfonate or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but increase alkylation-induced GC→CG transversions. In: *Mutagenesis* 8 (5), S. 457–465.
- Kolodner, Richard D.; Marsischky, Gerald T. (1999): Eukaryotic DNA mismatch repair. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 9 (1), S. 89–96. DOI: 10.1016/S0959-437X(99)80013-6.
- Koroleva, Olga; Makharashvili, Nodar; Courcelle, Charmain T.; Courcelle, Justin; Korolev, Sergey (2007): Structural conservation of RecF and Rad50: implications for DNA recognition and RecF function. In: *The EMBO journal* 26 (3), S. 867–877. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601537.
- Kow, Y. W. (1989): Mechanism of action of *Escherichia coli* exonuclease III. In: *Biochemistry* 28 (8), S. 3280–3287.
- Kowalczykowski, S. C.; Dixon, D. A.; Eggleston, A. K.; Lauder, S. D.; Rehrauer, W. M. (1994): Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. In: *Microbiological reviews* 58 (3), S. 401–465.
- Krokan, H. E.; Nilsen, H.; Skorpen, F.; Otterlei, M.; Slupphaug, G. (2000): Base excision repair of DNA in mammalian cells. In: *FEBS letters* 476 (1-2), S. 73–77.

- Kumagai, H. (2000): Microbial production of amino acids in Japan. In: *Advances in Biochemical Engineering* (69), S. 71–85.
- Kunkel, T. A. (1993): Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. In: *Nature* 365 (6443), S. 207–208. DOI: 10.1038/365207a0.
- Kunkel, Thomas A.; Erie, Dorothy A. (2005): DNA mismatch repair. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 681–710. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lahue, R. S.; Au, K. G.; Modrich, P. (1989): DNA mismatch correction in a defined system. In: *Science (New York, N.Y.)* 245 (4914), S. 160–164.
- Lam, S. T.; Stahl, M. M.; McMilin, K. D.; Stahl, F. W. (1974): Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. II. A mutation which causes hot spot activity. In: *Genetics* 77 (3), S. 425–433.
- Lawley, P. D.; Thatcher, C. J. (1970): Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. In: *The Biochemical journal* 116 (4), S. 693–707.
- Lee, Byung Il; Kim, Kyoung Hoon; Park, Soo Jeong; Eom, Soo Hyun; Song, Hyun Kyu; Suh, Se Won (2004): Ring-shaped architecture of RecR: implications for its role in homologous recombinational DNA repair. In: *The EMBO journal* 23 (10), S. 2029–2038. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600222.
- Lee, Jae Young; Chang, Judy; Joseph, Nimesh; Ghirlando, Rodolfo; Rao, Desirazu N.; Yang, Wei (2005): MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage. In: *Molecular cell* 20 (1), S. 155–166. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.08.019.
- Lee, S. Y.; Rasheed, S. (1990): A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. In: *BioTechniques* 9 (6), S. 676–679.
- Lemotte, P. K.; Walker, G. C. (1985): Induction and autoregulation of *ada*, a positively acting element regulating the response of *Escherichia coli* K-12 to methylating agents. In: *Journal of Bacteriology* 161 (3), S. 888–895.

- Lin, J. J.; Sancar, A. (1992): Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5' incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (25), S. 17688–17692.
- Lindahl, T. (1979): DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 22, S. 135–192.
- Lindahl, T. (1982): DNA repair enzymes. In: *Annual review of biochemistry* 51, S. 61–87. DOI: 10.1146/annurev.bi.51.070182.000425.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. In: *Nature* 362 (6422), S. 709–715. DOI: 10.1038/362709a0.
- Lindahl, T.; Barnes, D. E. (2000): Repair of endogenous DNA damage. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 65, S. 127–133.
- Lindahl, T.; Ljungquist, S.; Siegert, W.; Nyberg, B.; Sperens, B. (1977): DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 252 (10), S. 3286–3294.
- Lindahl, T.; Nyberg, B. (1972): Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. In: *Biochemistry* 11 (19), S. 3610–3618.
- LINDAHL, TOMAS (1976): New class of enzymes acting on damaged DNA. In: *Nature* 259 (5538), S. 64–66. DOI: 10.1038/259064a0.
- LINDAHL, TOMAS; Ljungquist, Siv (1975): Apurinic and Apyrimidinic Sites in DNA. Molecular Mechanisms for Repair of DNA: Part A. In: Philip C. Hanawalt und Richard B. Setlow (Hg.). Boston, MA: Springer US, S. 31–38. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7_5.
- LINDAHL, TOMAS; Sedgwick, Barbara; Sekiguchi, Mutsuo; Nakabeppu, Yusaku (1988): Regulation and Expression of the Adaptive Response to Alkylating Agents. In: *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1), S. 133–157. DOI: 10.1146/annurev.bi.57.070188.001025.
- Lloyd, R. G. (1991): Conjugational recombination in resolvase-deficient *ruvC* mutants of *Escherichia coli* K-12 depends on *recG*. In: *J. Bacteriol.* 173 (17), S. 5414–5418. DOI: 10.1128/jb.173.17.5414-5418.1991.

Lloyd, Robert G.; Rudolph, Christian J. (2016): 25 years on and no end in sight: a perspective on the role of RecG protein. In: *Current genetics*. DOI: 10.1007/s00294-016-0589-z.

Lloyd, Robert G.; Sharples, Gary J. (1993): Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of *Escherichia coli*. In: *Nucl Acids Res* 21 (8), S. 1719–1725. DOI: 10.1093/nar/21.8.1719.

Loeb, L. A.; Preston, B. D. (1986): Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. In: *Annual review of genetics* 20, S. 201–230. DOI: 10.1146/annurev.ge.20.120186.001221.

Lovett, S. T.; Clark, A. J. (1984): Genetic analysis of the recJ gene of *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 157 (1), S. 190–196.

Lovett, S. T.; Kolodner, R. D. (1989): Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8), S. 2627–2631.

Lu, A. L.; Li, X.; Gu, Y.; Wright, P. M.; Chang, D. Y. (2001): Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. In: *Cell biochemistry and biophysics* 35 (2), S. 141–170. DOI: 10.1385/CBB:35:2:141.

Lu, A-Lien; Chang, Dau-Yin (1988): A novel nucleotide excision repair for the conversion of an A/G mismatch to C/G base pair in *E. coli*. In: *Cell* 54 (6), S. 805–812. DOI: 10.1016/S0092-8674(88)91109-9.

Luisi-DeLuca, C.; Kolodner, R. (1994): Purification and characterization of the *Escherichia coli* RecO protein. Renaturation of complementary single-stranded DNA molecules catalyzed by the RecO protein. In: *Journal of Molecular Biology* 236 (1), S. 124–138. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1123.

Lusetti, Shelley L.; Cox, Michael M. (2002): The Bacterial RecA Protein and the Recombinational DNA Repair of Stalled Replication Forks. In: *Annu. Rev. Biochem.* 71 (1), S. 71–100. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.083101.133940.

Madiraju, M. V.; Clark, A. J. (1992): Evidence for ATP binding and double-stranded DNA binding by *Escherichia coli* RecF protein. In: *Journal of Bacteriology* 174 (23), S. 7705–7710.

Maki, H.; Sekiguchi, M. (1992): MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. In: *Nature* 355 (6357), S. 273–275. DOI: 10.1038/355273a0.

Malta, Erik; Moolenaar, Geri F.; Goosen, Nora (2007): Dynamics of the UvrABC nucleotide excision repair proteins analyzed by fluorescence resonance energy transfer. In: *Biochemistry* 46 (31), S. 9080–9088. DOI: 10.1021/bi7002235.

Manosas, Maria; Perumal, Senthil K.; Bianco, Piero R.; Ritort, Felix; Benkovic, Stephen J.; Croquette, Vincent (2013): RecG and UvsW catalyse robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. In: *Nature communications* 4, S. 2368. DOI: 10.1038/ncomms3368.

Mazur, S. J.; Grossman, L. (1991): Dimerization of *Escherichia coli* UvrA and its binding to undamaged and ultraviolet light damaged DNA. In: *Biochemistry* 30 (18), S. 4432–4443.

McCarthy, T. V.; Karran, P.; Lindahl, T. (1984): Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidines in *Escherichia coli*. In: *The EMBO journal* 3 (3), S. 545–550.

McCarthy, Tommie V.; LINDAHL, TOMAS (1985): Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*. In: *Nucl Acids Res* 13 (8), S. 2683–2698. DOI: 10.1093/nar/13.8.2683.

McGlynn, P. (2000): Characterisation of the catalytically active form of RecG helicase. In: *Nucleic Acids Research* 28 (12), S. 2324–2332. DOI: 10.1093/nar/28.12.2324.

McGlynn, P.; Al-Deib, A. A.; Liu, J.; Marians, K. J.; Lloyd, R. G. (1997): The DNA replication protein PriA and the recombination protein RecG bind D-loops. In: *Journal of Molecular Biology* 270 (2), S. 212–221. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1120.

McGlynn, P.; Lloyd, R. G. (2001a): Action of RuvAB at replication fork structures. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (45), S. 41938–41944. DOI: 10.1074/jbc.M107945200.

McGlynn, P.; Lloyd, R. G. (2001b): Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (15), S. 8227–8234. DOI: 10.1073/pnas.111008698.

McGlynn, P.; Lloyd, R. G.; Marians, K. J. (2001): Formation of Holliday junctions by regression of nascent DNA in intermediates containing stalled replication forks: RecG stimulates regression even when the DNA is negatively supercoiled. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (15), S. 8235–8240. DOI: 10.1073/pnas.121007798.

- McGlynn, Peter; Lloyd, Robert G. (2002a): Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. In: *Trends in genetics : TIG* 18 (8), S. 413–419.
- McGlynn, Peter; Lloyd, Robert G. (2002b): Recombinational repair and restart of damaged replication forks. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (11), S. 859–870. DOI: 10.1038/nrm951.
- Mendonca, V. M.; Kaiser-Rogers, K.; Matson, S. W. (1993): Double helicase II (uvrD)-helicase IV (hldD) deletion mutants are defective in the recombination pathways of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 175 (15), S. 4641–4651. DOI: 10.1128/jb.175.15.4641-4651.1993.
- Modrich, P.; Lahue, R. (1996): Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. In: *Annual review of biochemistry* 65, S. 101–133. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.000533.
- Morimatsu, Katsumi; Kowalczykowski, Stephen C. (2003): RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. In: *Molecular cell* 11 (5), S. 1337–1347.
- Morimatsu, Katsumi; Kowalczykowski, Stephen C. (2014): RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (48), E5133-E5142. DOI: 10.1073/pnas.1420009111.
- Muskavitch, K. M.; Linn, S. (1982): A unified mechanism for the nuclease and unwinding activities of the recBC enzyme of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (5), S. 2641–2648.
- Myers, R. S.; Stahl, F. W. (1994): Chi and the RecBC D enzyme of *Escherichia coli*. In: *Annual review of genetics* 28, S. 49–70. DOI: 10.1146/annurev.ge.28.120194.000405.
- Neeley, William L.; Essigmann, John M. (2006): Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. In: *Chemical research in toxicology* 19 (4), S. 491–505. DOI: 10.1021/tx0600043.
- Nickoloff, J. A.; Singer, J. D.; Hoekstra, M. F.; Heffron, F. (1989): Double-strand breaks stimulate alternative mechanisms of recombination repair. In: *Journal of Molecular Biology* 207 (3), S. 527–541.

- Nieminuszczy, Jadwiga; Grzesiuk, Elzbieta (2007): Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. In: *Acta biochimica Polonica* 54 (3), S. 459–468.
- Nikjoo, H.; O'Neill, P.; Goodhead, D. T.; Terrissol, M. (1997): Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. In: *International journal of radiation biology* 71 (5), S. 467–483.
- Nilsen, H.; Krokan, H. E. (2001): Base excision repair in a network of defence and tolerance. In: *Carcinogenesis* 22 (7), S. 987–998.
- Noll, D. M.; Gogos, A.; Granek, J. A.; Clarke, N. D. (1999): The C-terminal domain of the adenine-DNA glycosylase MutY confers specificity for 8-oxoguanine.adenine mispairs and may have evolved from MutT, an 8-oxo-dGTPase. In: *Biochemistry* 38 (20), S. 6374–6379. DOI: 10.1021/bi990335x.
- O'Connor, T. R.; Laval, J. (1989): Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/aprimidinic sites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14), S. 5222–5226.
- Olsson, M.; Lindahl, T. (1980): Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (22), S. 10569–10571.
- Orren, D. K.; Sancar, A. (1989): The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14), S. 5237–5241.
- Orren, D. K.; Selby, C. P.; Hearst, J. E.; Sancar, A. (1992): Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (2), S. 780–788.
- Parsons, C. A.; Tsaneva, I.; Lloyd, R. G.; West, S. C. (1992): Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12), S. 5452–5456.

Parsons, Carol A.; West, Stephen C. (1993): Formation of a RuvAB-Holliday Junction Complex in Vitro. In: *Journal of Molecular Biology* 232 (2), S. 397–405. DOI: 10.1006/jmbi.1993.1399.

Pearl, L. H. (2000): Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. In: *Mutation research* 460 (3-4), S. 165–181.

Pegg, Anthony E. (2011): Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. In: *Chemical research in toxicology* 24 (5), S. 618–639. DOI: 10.1021/tx200031q.

Pfeiffer, P.; Goedecke, W.; Obe, G. (2000): Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. In: *Mutagenesis* 15 (4), S. 289–302.

Potter, P. M.; Wilkinson, M. C.; Fitton, J.; Carr, F. J.; Brennand, J.; Cooper, D. P.; Margison, G. P. (1987): Characterisation and nucleotide sequence of ogt, the O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. In: *Nucleic Acids Research* 15 (22), S. 9177–9193.

Povirk, L. F.; Steighner, R. J. (1989): Oxidized apurinic/apyrimidinic sites formed in DNA by oxidative mutagens. In: *Mutation research* 214 (1), S. 13–22.

Radding, C. M. (1982): Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. In: *Annual review of genetics* 16, S. 405–437. DOI: 10.1146/annurev.ge.16.120182.002201.

Radding, C. M. (1988): Homologous pairing and strand exchange promoted by *Escherichia coli* RecA protein. In: Genetic recombination: American Society for Microbiology Washington, DC, S. 193–229.

Rafferty, J. B.; Sedelnikova, S. E.; Hargreaves, D.; Artymiuk, P. J.; Baker, P. J.; Sharples, G. J. et al. (1996): Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5286), S. 415–421.

Rebeck, G. W.; Samson, L. (1991): Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the ogt O6-methylguanine DNA repair methyltransferase. In: *J. Bacteriol.* 173 (6), S. 2068–2076. DOI: 10.1128/jb.173.6.2068-2076.1991.

Resende, B.C.; Rebelato, A.B.; D'Afonseca, V.; Santos, A.R.; Stutzman, T.; Azevedo, V.A. et al. (2011): DNA repair in *Corynebacterium* model. In: *Gene* 482 (1-2), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.gene.2011.03.008.

- Rhaese, H. J.; Freese, E. (1968): Chemical analysis of DNA alterations. I. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine. In: *Biochimica et biophysica acta* 155 (2), S. 476–490.
- Roberts, J. W.; Roberts, C. W.; Craig, N. L. (1978): *Escherichia coli* recA gene product inactivates phage lambda repressor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (10), S. 4714–4718.
- Roca, A. I.; Cox, M. M. (1990): The RecA protein: structure and function. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 25 (6), S. 415–456. DOI: 10.3109/10409239009090617.
- Rocha, Eduardo P. C.; Cornet, Emmanuel; Michel, Benedicte (2005): Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. In: *PLoS genetics* 1 (2), e15. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010015.
- Roe, S.Mark; Barlow, Tom; Brown, Tom; Oram, Mark; Keeley, Anthony; Tsaneva, Irina R.; Pearl, Laurence H. (1998): Crystal Structure of an Octameric RuvA–Holliday Junction Complex. In: *Molecular cell* 2 (3), S. 361–372. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80280-4.
- Rudolph, Christian J.; Mahdi, Akeel A.; Upton, Amy L.; Lloyd, Robert G. (2010): RecG protein and single-strand DNA exonucleases avoid cell lethality associated with PriA helicase activity in *Escherichia coli*. In: *Genetics* 186 (2), S. 473–492. DOI: 10.1534/genetics.110.120691.
- Rupp, W. D.; Howard-Flanders, P. (1968): Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. In: *Journal of Molecular Biology* 31 (2), S. 291–304.
- Rydberg, B.; Lindahl, T. (1982): Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. In: *The EMBO journal* 1 (2), S. 211–216.
- Ryzhikov, Mikhail; Gupta, Richa; Glickman, Michael; Korolev, Sergey (2014): RecO protein initiates DNA recombination and strand annealing through two alternative DNA binding mechanisms. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (42), S. 28846–28855. DOI: 10.1074/jbc.M114.585117.
- Samson, L. (1992): The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes. In: *Molecular microbiology* 6 (7), S. 825–831.

Samson, L.; Cairns, J. (1977): A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. In: *Nature* 267 (5608), S. 281–283.

Sancar, A. (1994): Mechanisms of DNA excision repair. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5193), S. 1954–1956.

Satoh, M. S.; Jones, C. J.; Wood, R. D.; Lindahl, T. (1993): DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13), S. 6335–6339.

Schäfer, Andreas; Tauch, Andreas; Jäger, Wolfgang; Kalinowski, Jörn; Thierbach, Georg; Pühler, Alfred (1994): Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Gene* 145 (1), S. 69–73. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90324-7.

Schendel, P. F.; Robins, P. E. (1978): Repair of O6-methylguanine in adapted *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (12), S. 6017–6020.

SHAH, R. (1994): Genetic recombination in *E. coli*. RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots in vitro. In: *Cell* 79 (5), S. 853–864. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90074-4.

Sharples, Gary J.; Ingleston, Stuart M.; Lloyd, Robert G. (1999): Holliday Junction Processing in Bacteria: Insights from the Evolutionary Conservation of RuvABC, RecG, and RusA. In: *Journal of Bacteriology* 181 (18), S. 5543–5550.

Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. (1991): Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. In: *Nature* 349 (6308), S. 431–434. DOI: 10.1038/349431a0.

Sinden, R. R.; Cole, R. S. (1978): Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen and light: effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism. In: *Journal of Bacteriology* 136 (2), S. 538–547.

Singer, B.; Kusmierek, J. T. (1982): Chemical mutagenesis. In: *Annual review of biochemistry* 51, S. 655–693. DOI: 10.1146/annurev.bi.51.070182.003255.

- Sinha, Krishna Murari; Unciuleac, Mihaela-Carmen; Glickman, Michael S.; Shuman, Stewart (2009): AdnAB: a new DSB-resecting motor-nuclease from mycobacteria. In: *Genes & development* 23 (12), S. 1423–1437. DOI: 10.1101/gad.1805709.
- Skerra, A.; Schmidt, T. G. (1999): Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. In: *Biomolecular engineering* 16 (1-4), S. 79–86.
- Slupphaug, G.; Mol, C. D.; Kavli, B.; Arvai, A. S.; Krokan, H. E.; Tainer, J. A. (1996): A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. In: *Nature* 384 (6604), S. 87–92. DOI: 10.1038/384087a0.
- Smith, G. R.; Amundsen, S. K.; Dabert, P.; Taylor, A. F. (1995): The initiation and control of homologous recombination in *Escherichia coli*. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 347 (1319), S. 13–20. DOI: 10.1098/rstb.1995.0003.
- Smith, G. R.; Kunes, S. M.; Schultz, D. W.; Taylor, A.; Triman, K. L. (1981): Structure of chi hotspots of generalized recombination. In: *Cell* 24 (2), S. 429–436.
- Smith, K. C.; Wang, T. C. (1989): recA-dependent DNA repair processes. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 10 (1), S. 12–16. DOI: 10.1002/bies.950100104.
- Stahl, F. W.; Stahl, M. M. (1974): A role for recBC nuclease in the distribution of crossovers along unreplicated chromosomes of phage lambda. In: *Molecular & general genetics : MGG* 131 (1), S. 27–30.
- Stivers, James T. (2008): Extrahelical damaged base recognition by DNA glycosylase enzymes. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14 (3), S. 786–793. DOI: 10.1002/chem.200701501.
- Streisinger, G.; Okada, Y.; Emrich, J.; Newton, J.; Tsugita, A.; Terzaghi, E.; Inouye, M. (1966): Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 31, S. 77–84.

- Su, S. S.; Lahue, R. S.; Au, K. G.; Modrich, P. (1988): Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (14), S. 6829–6835.
- Svilar, David; Goellner, Eva M.; Almeida, Karen H.; Sobol, Robert W. (2011): Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. In: *Antioxidants & redox signaling* 14 (12), S. 2491–2507. DOI: 10.1089/ars.2010.3466.
- Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annual review of genetics* 45, S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.
- Taylor, A. F.; Schultz, D. W.; Ponticelli, A. S.; Smith, G. R. (1985): RecBC enzyme nicking at Chi sites during DNA unwinding: location and orientation-dependence of the cutting. In: *Cell* 41 (1), S. 153–163.
- Teo, I.; Sedgwick, B.; Demple, B.; Li, B.; Lindahl, T. (1984): Induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*: the *ada+* gene product serves both as a regulatory protein and as an enzyme for repair of mutagenic damage. In: *The EMBO journal* 3 (9), S. 2151–2157.
- Truglio, James J.; Croteau, Deborah L.; Skorvaga, Milan; DellaVecchia, Matthew J.; Theis, Karsten; Mandavilli, Bhaskar S. et al. (2004): Interactions between UvrA and UvrB: the role of UvrB's domain 2 in nucleotide excision repair. In: *The EMBO journal* 23 (13), S. 2498–2509. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600263.
- Truglio, James J.; Karakas, Erkan; Rhau, Benjamin; Wang, Hong; DellaVecchia, Matthew J.; van Houten, Bennett; Kisker, Caroline (2006): Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB. In: *Nature structural & molecular biology* 13 (4), S. 360–364. DOI: 10.1038/nsmb1072.
- Tsaneva, Irina R.; Müller, Berndt; West, Stephen C. (1992): ATP-dependent branch migration of holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. In: *Cell* 69 (7), S. 1171–1180. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90638-S.
- Tubbs, Julie L.; Pegg, Anthony E.; Tainer, John A. (2007): DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its

implications for cancer chemotherapy. In: *DNA Repair* 6 (8), S. 1100–1115. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.03.011.

Umezū, K.; Kolodner, R. D. (1994): Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (47), S. 30005–30013.

Unciuleac, Mihaela-Carmen; Shuman, Stewart (2010a): Characterization of the mycobacterial AdnAB DNA motor provides insights into the evolution of bacterial motor-nuclease machines. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (4), S. 2632–2641. DOI: 10.1074/jbc.M109.076133.

Unciuleac, Mihaela-Carmen; Shuman, Stewart (2010b): Double strand break unwinding and resection by the mycobacterial helicase-nuclease AdnAB in the presence of single strand DNA-binding protein (SSB). In: *The Journal of biological chemistry* 285 (45), S. 34319–34329. DOI: 10.1074/jbc.M110.162925.

van de Putte, P.; van Sluis, C. A.; van Dillewijn, J.; Rorsch, A. (1965): The location of genes controlling radiation sensitivity in *Escherichia coli*. In: *Mutation research* 2 (2), S. 97–110.

van Houten, B. (1990): Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. In: *Microbiological reviews* 54 (1), S. 18–51.

Varshney, U.; Hutcheon, T.; van de Sande, J H (1988): Sequence analysis, expression, and conservation of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase and its gene (*ung*). In: *The Journal of biological chemistry* 263 (16), S. 7776–7784.

Vieira, J.; Messing, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. In: *Gene* 19 (3), S. 259–268.

Vincent, S. D.; Mahdi, A. A.; Lloyd, R. G. (1996): The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. In: *Journal of Molecular Biology* 264 (4), S. 713–721. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0671.

Wakaki, S.; Marumo, H.; Tomioka, K.; Shimizu, G.; Kato, E.; Kamada, H. et al. (1958): Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. In: *Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill.)* 8 (5), S. 228–240.

Wang, T. V.; Smith, K. C. (1984): recF-dependent and recF recB-independent DNA gap-filling repair processes transfer dimer-containing parental strands to daughter strands in *Escherichia coli* K-12 uvrB. In: *Journal of Bacteriology* 158 (2), S. 727–729.

Warner, H. R.; Demple, B. F.; Deutsch, W. A.; Kane, C. M.; Linn, S. (1980): Apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of pyrimidine dimers and other lesions in DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (8), S. 4602–4606.

Webb, B. L.; Cox, M. M.; Inman, R. B. (1995): An interaction between the *Escherichia coli* RecF and RecR proteins dependent on ATP and double-stranded DNA. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (52), S. 31397–31404.

Webb, B. L.; Cox, M. M.; Inman, R. B. (1997): Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. In: *Cell* 91 (3), S. 347–356.

Webb, B. L.; Cox, M. M.; Inman, R. B. (1999): ATP hydrolysis and DNA binding by the *Escherichia coli* RecF protein. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (22), S. 15367–15374.

Weinstock, G. M. (1987): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. In: *American Society for Microbiology* Vol. 2., 1987, pp. 1034–1043.

Weiss, Bernard (1952): 12 Exodeoxyribonucleases of *Escherichia coli*. In: James B. Sumner (Hg.): *The enzymes. Chemistry and mechanism of action*, Bd. 14. New York: Acad. Pr (The Enzymes), S. 203–231.

Weiss, Bernard (1981): 12 Exodeoxyribonucleases of *Escherichia coli*. In: Paul D. Boyer (Hg.): *The Enzymes*, Bd. 14: Academic Press, S. 203–231.

Weng, Mao-wen; Zheng, Yi; Jasti, Vijay P.; Champeil, Elise; Tomasz, Maria; Wang, Yinsheng et al. (2010): Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. In: *Nucleic Acids Research* 38 (20), S. 6976–6984. DOI: 10.1093/nar/gkq576.

West, S. C. (1996): The RuvABC proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* 178 (5), S. 1237–1241. DOI: 10.1128/jb.178.5.1237-1241.1996.

- West, S. C.; Cassuto, E.; Howard-Flanders, P. (1981): Mechanism of *E. coli* RecA protein directed strand exchanges in post-replication repair of DNA. In: *Nature* 294 (5842), S. 659–662.
- Whitby, M. C.; Lloyd, R. G. (1995): Branch migration of three-strand recombination intermediates by RecG, a possible pathway for securing exchanges initiated by 3'-tailed duplex DNA. In: *The EMBO journal* 14 (14), S. 3302–3310.
- Whitby, M. C.; Lloyd, R. G. (1998): Targeting Holliday Junctions by the RecG Branch Migration Protein of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (31), S. 19729–19739. DOI: 10.1074/jbc.273.31.19729.
- Whitby, Matthew C.; Ryder, Lizanne; Lloyd, Robert G. (1993): Reverse branch migration of holliday junctions by RecG protein. A new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. In: *Cell* 75 (2), S. 341–350. DOI: 10.1016/0092-8674(93)80075-P.
- Wiederhold, Lee; Leppard, John B.; Kedar, Padmini; Karimi-Busheri, Feridoun; Rasouli-Nia, Aghdass; Weinfeld, Michael et al. (2004): AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. In: *Molecular cell* 15 (2), S. 209–220. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.06.003.
- Wigley, Dale B. (2013): Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. In: *Nature reviews. Microbiology* 11 (1), S. 9–13. DOI: 10.1038/nrmicro2917.
- Wood, R. D. (1999): DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. In: *Biochimie* 81 (1-2), S. 39–44.
- Xu, Guangzhi; Wang, Liangyan; Chen, Huan; Lu, Huiming; Ying, Nanjiao; Tian, Bing; Hua, Yuejin (2008a): RecO is essential for DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. In: *J Bacteriol* 190 (7), S. 2624–2628. DOI: 10.1128/JB.01851-07.
- Xu, Guogang; Herzig, Maryanne; Rotrekl, Vladimir; Walter, Christi A. (2008b): Base excision repair, aging and health span. In: *Mechanisms of ageing and development* 129 (7-8), S. 366–382. DOI: 10.1016/j.mad.2008.03.001.

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. In: *Gene* 33 (1), S. 103–119.

Yu, Misook; Souaya, Jehanne; Julin, Douglas A. (1998): The 30-kDa C-terminal domain of the RecB protein is critical for the nuclease activity, but not the helicase activity, of the RecBCD enzyme from *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (3), S. 981–986.

Yu, Sung-Lim; Lee, Sung-Keun; Johnson, Robert E.; Prakash, Louise; Prakash, Satya (2003): The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. In: *Molecular and cellular biology* 23 (1), S. 382–388.

Zhang, Q.-M.; Ishikawa, N.; Nakahara, T.; Yonei, S. (1998): *Escherichia coli* MutY protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine. Guanine mispair to prevent spontaneous G:C->C:G transversions. In: *Nucleic Acids Research* 26 (20), S. 4669–4675. DOI: 10.1093/nar/26.20.4669.

Zharkov, D. O. (2008): Base excision DNA repair. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (10), S. 1544–1565. DOI: 10.1007/s00018-008-7543-2.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>C. glutamicum</i>	18
Abbildung 2: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung	22
Abbildung 3: DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung	23
Abbildung 4: Strukturformel von Zeocin	24
Abbildung 5: Struktur von Mitomycin C	25
Abbildung 6: DNA-Schädigungen durch MNNG	25
Abbildung 7: Vereinfachte schematische Darstellung der BER	30
Abbildung 8: Funktionsschema mono- und bifunktionaler DNA-Glykosylasen (short patch) .	32
Abbildung 9: Mechanismus der NER	36
Abbildung 10: Mechanismus des RecBCD-Weges der RR	41
Abbildung 11: Darstellung des RecFOR-Weges der RR	43
Abbildung 12: Überblick und genaue molekulare Funktion von RecA	46
Abbildung 13: Funktionsweise von RuvABC, Auflösung der Holliday Strukturen.....	48
Abbildung 14: 1 kb-Größenmarker von invitrogen, 100 bp-Größenmarker von New England	77
Abbildung 15: Plasmidkarte von pk19mobsacB	82
Abbildung 16: Design der Primer zur Amplifikation der 5'- und 3'-Region des Zielgens.....	91
Abbildung 17: Fusion der beiden flankierenden Bereiche mittels PCR	93
Abbildung 18: Konstruktionsschema eines Deletionsplasmids am Beispiel von <i>recA</i>	94
Abbildung 19: Ergebnis der UV-Mutagenese von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	104
Abbildung 20: Resultat der etablierten Zeocin-Mutagenese von ATCC 13032	105
Abbildung 21: Überlebensraten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 nach der Behandlung mit	106
Abbildung 22: Ergebnis der MNNG-Mutagenese von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	107

Abbildung 23: Überlebensraten der DR-Mutanten FD4 und FD15 bei zunehmender UV- ...	108
Abbildung 24: Überlebensraten der DR-Mutanten von <i>C. glutamicum</i> Δ ogt und Δ alkB in ..	109
Abbildung 25: Überlebensraten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und den Mutanten ogt und	110
Abbildung 26: Überlebensraten des Referenzstammes <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und der	111
Abbildung 27: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten	113
Abbildung 28: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion	115
Abbildung 29: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion	117
Abbildung 30: Überlebensraten des Wildtyps ATCC 13032 und von Mutanten mit Deletion	119
Abbildung 31: Überlebensraten des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und der davon ..	121
Abbildung 32: Überlebensraten des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und der davon ..	122
Abbildung 33: Überlebensraten des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und der davon ..	123
Abbildung 34: Überlebensraten des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und der davon ..	124
Abbildung 35: Überlebensraten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und den in der	126
Abbildung 36: Überlebensraten der Deletionsstämme der RR und des Referenzstammes <i>C.</i>	127
Abbildung 37: Überlebensraten der Deletionsmutanten aus der RR und des Wildtyps von <i>C.</i>	129
Abbildung 38: Überlebensraten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und den	130
Abbildung 39: Elektrophoretische Auftrennung von RecJ nach der Strep-Tag-Aufreinigung	132
Abbildung 40: SDS-PAGE nach Male-RecB-Aufreinigung aus FD48	134

Abbildung 41: Exonukleaseaktivitätsnachweis RecJ	135
Abbildung 42: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ aus <i>C. glutamicum</i> und RecJ _f ..	136
Abbildung 43: Natives Polyacrylamidgel zur Überprüfung der DNA-Degradierung durch....	138
Abbildung 44: Degradierung der DNA durch RecJ aus <i>C. glutamicum</i> mit zunehmender.....	140
Abbildung 45: Konstruierte Y-förmige Duplex-DNA zum Nachweis der Nuklease- bzw.	141
Abbildung 46: Nachweis der Nukleaseaktivität und ATP-Abhängigkeit von RecB mittels FITC-	142
Abbildung 47: Y-förmige DNA-Konstrukte zur Überprüfung der Nukleaseaktivität	143
Abbildung 48: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ aus <i>C. glutamicum</i>	144
Abbildung 49: Substratspezifische Nukleaseaktivität von RecB aus <i>C. glutamicum</i>	146
Abbildung 50: DNA-Konstrukte zur Charakterisierung der Nukleaseaktivität von RecJ und.	147
Abbildung 51: Überprüfung der Nukleaseaktivität von RecJ und RecB aus <i>C. glutamicum</i> ..	148
Abbildung 52: Vermutete Funktionsweise von RecJ	171
Abbildung 53: Mögliche Funktionsweise von RecB	173

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der vorgestellten Gene der DNA-Reparatur in <i>E. coli</i> bzw. <i>C. glutamicum</i>	50
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme mit relevantem Genotyp.....	53
Tabelle 3: Vorgefertigte Plasmide	53
Tabelle 4: In dieser Arbeit entstandene Knock-out-Plasmide zur markerfreien Deletion von DNA Reparatur	54
Tabelle 5: In dieser Arbeit entstandene Plasmide zur Expression von RecJ und RecB.....	55
Tabelle 6: Hersteller und Verwendungszweck der eingesetzten Enzyme	56

Tabelle 7: Hersteller und Zweck der verwendeten Kits	56
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionsmutanten	57
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide.....	61
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide zum Aktivitätsnachweis von RecJ und RecB	61
Tabelle 11: Verwendete Antibiotika	63
Tabelle 12: Verwendete Medienzusätze.....	63
Tabelle 13: Übersicht der erhaltenen Deletionsstämme	102
Tabelle 14: Übersicht der Mehrfach-Mutanten.....	102
Tabelle 15: Genausstattung von <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i> bezüglich DNA-Reparatur.....	150
Tabelle 16: Übersicht der Mutagenese-Ergebnisse der Mutanten.....	174

8 Lebenslauf

Fabiola Kautzmann (geb. Dobler)

Geboren am 01.04.1987 in Backnang

Schulische Ausbildung:

- | | |
|-------------|---|
| 1993 - 1997 | Conrad-Weiser-Schule Großaspach |
| 1997 - 2006 | Gymnasium in der Taus, Backnang, (Abitur) |

Akademische Ausbildung:

- | | |
|-------------|--|
| 2006 - 2012 | Studium der Biologie (Diplom)
Universität Ulm

Diplomarbeit am Institut für Molekulare Botanik zum Thema
"Identifikation von Interaktionspartnern spezifischer mitochondrialer
RNA-Editingfaktoren" |
| 2012 - 2017 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit der Möglichkeit zur Anfertigung der
Promotion bei Prof. Dr. Ralf Mattes am Institut für Industrielle Genetik
der Universität Stuttgart |