
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Naturwissenschaftliche Fakultät I
Institut für Biochemie und Biotechnologie

**Charakterisierung zytosolischer 5'-Nukleotidasen aus Mensch und
*Drosophila melanogaster***

Promotionsarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rer. nat.

angefertigt am

Institut für Biochemie und Biotechnologie

von

Juliane Buschmann

geboren am 19. Januar 1986 in Arnstadt.

Gutachter

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Milton Stubbs

Prof. Dr. Norbert Sträter

Verteidigt: 23.08.2016, Halle (Saale)

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung.....	5
2.1	Die Familie der 5'-Nukleotidasen – eine Übersicht	6
2.2	Der Nukleotidstoffwechsel.....	7
2.2.1	Homöostase des intrazellulären Nukleotidpools	8
2.2.2	Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen im Nukleotidstoffwechsel.....	13
2.3	Struktur bedingt Katalyse	14
2.3.1	Strukturmerkmale der zytosolischen 5'-Nukleotidasen.....	14
2.3.2	Gemeinsamer Katalysemechanismus.....	17
2.4	Die humanen 5'-Nukleotidasen 2 und 3A	19
2.4.1	Die zytosolische 5'-Nukleotidase 2.....	19
2.4.2	Die zytosolische Nukleotidase 3A.....	23
2.5	Identifizierung einer m^7 GMP-spezifischen 5'-Nukleotidase.....	27
2.6	Zielstellung.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Die m^7 GMP-spezifische 5'-Nukleotidase <i>cN3B</i> aus <i>D. melanogaster</i>	31
3.1.1	Das Gen CG3362 und seine Expression in <i>D. melanogaster</i>	31
3.1.2	$^{Dm}cN3B$ -Konservierung	33
3.1.3	$^{Dm}cN3B$ -Expression in allen Entwicklungsstadien.....	34
3.1.4	Lokalisierung im <i>D. melanogaster</i> -Embryo.....	35
3.1.5	Rekombinante Darstellung der $^{Dm}cN3B$	36
3.1.6	$^{Dm}cN3B$ ist ein Monomer.....	37
3.1.7	Etablierung eines colorimetrischen Dephosphorylierungstestes	38
3.1.8	Enzymologische Charakterisierung	39
3.1.9	Die $^{Dm}cN3B$ ist m^7 GMP spezifisch	41
3.1.10	5'-AMP wirkt in hohen Konzentrationen inhibierend	44
3.1.11	Die $^{Dm}cN3B$ dephosphoryliert auch m^7 GDP.....	45
3.1.12	Die $^{Dm}cN3B$ weist keine Phosphotransferase-Aktivität auf.....	47
3.2	Die humanen zytosolischen Pyrimidin-Nukleotidasen.....	49
3.2.1	$^{Hs}cN3B$, eine putative m^7 GMP-spezifische 5'-Nukleotidase	50
3.2.2	$^{Hs}cN3B$ katalysiert auch die m^7 GMP-Dephosphorylierung	51
3.2.3	$^{Hs}cN3A$ kann ebenfalls m^7 GMP dephosphorylieren.....	53
3.3	$^{Dm}cN2$, die zweite zytosolische 5'-Nukleotidase in <i>D. melanogaster</i>	54
3.3.1	Homologiestudien identifizieren das Gen CG32549.....	54
3.3.2	Die rekombinante Darstellung von $^{Dm}cN2$	57
3.3.3	Die $^{Dm}cN2$ ist ein Tetramer.....	58
3.3.4	Enzymologische Charakterisierung der $^{Dm}cN2$	60
3.3.5	Die $^{Dm}cN2$ weist hohe K_M -Werte für alle Substrate auf	61
3.3.6	Die $^{Hs}cN2$ ist 5'-GMP-spezifisch.....	64
3.4	Kristallstrukturanalysen	66

3.4.1	<i>Dm</i> cN3B-Kristallstruktur zur Untersuchung der Substraterkennung	66
3.4.2	<i>Dm</i> cN3B-Mutanten zur Klärung der Substratpräferenz	71
3.5	Physiologische Bedeutung der zytosolischen 5'-Nukleotidasen in <i>D. melanogaster</i> ...	75
3.5.1	Eine präzise Deletion des <i>Dm</i> cn3b-Gens	75
3.5.2	<i>Dm</i> cN3B ^{-/-} -Fliegen zeigen eine Entwicklungsstörung	77
3.5.3	M ⁷ GMP wird in <i>Dm</i> cN3B ^{-/-} -Embryoextrakt nicht dephosphoryliert	82
3.5.4	Kein Einbau von m ⁷ G-Nukleotiden in ribosomale RNA	83
3.5.5	Veränderungen des zellulären Nukleotidpools in <i>Dm</i> cN3B ^{-/-} -Embryonen	85
3.5.6	<i>Dm</i> cN3B ^{-/-} -Embryonen weisen eine signifikant erhöhte dTTP-Konzentration auf	87
3.5.7	<i>Dm</i> cN2-knockout mit dem CRISPR-Cas 9-System	89
4	Diskussion	93
4.1	Die Substratspezifität der untersuchten 5'-Nukleotidasen ist gut konserviert	93
4.2	Kristallstrukturanalysen der 5'-Nukleotidasen erklären deren Substratspezifität	96
4.3	Der spezifische Abbau von m ⁷ GMP	99
4.4	Physiologische Funktion der 5'-Nukleotidasen in <i>D. melanogaster</i>	103
4.5	Ursachen für die gestörte Embryogenese der <i>Dm</i> cN3B ^{-/-} -Embryonen	109
4.6	Zusammenfassung und Ausblick	112
5	Material und Methoden	115
5.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	115
5.2	Verwendete Fliegenstämme	115
5.3	Zellkultivierung	115
5.3.1	Kultivierung von Schneider 2-Drosophila-Zellen	115
5.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	116
5.4	Molekularbiologische Methoden	117
5.4.1	RNA-Isolation	117
5.4.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion	117
5.4.3	Klonierung	118
5.4.4	Die cDNA-Generierung von CG32549	119
5.4.5	Mutagenesereaktion	120
5.5	Proteinchemische Methoden	120
5.5.1	Expression und Aufschluss	120
5.5.2	Proteinreinigung	121
5.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	126
5.5.4	Analyse der Proteingesamt molekülmasse mittels MALDI-TOF-MS	126
5.5.5	Ultrazentrifugation	127
5.5.6	Westernblot-Analyse	127
5.5.7	Antikörperreinigung	128
5.6	Biochemische Methoden	129
5.6.1	Darstellung von ³² P-m ⁷ GMP und ³² P-m ⁷ G-cap-RNA	129
5.6.2	Darstellung von ³² P-NMPs	129

5.6.3	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	130
5.6.4	<i>Phosphattest mit Malachitgrünnoxalat</i>	130
5.6.5	<i>Standardbedingungen für die kinetischen Messungen</i>	131
5.6.6	<i>Präparation ribosomaler RNA und deren Abbau zu Nucleosiden</i>	132
5.6.7	<i>Nucleosidanalyse über HPLC und Massenspektrometrie</i>	133
5.6.8	<i>Nucleotidextraktion</i>	133
5.6.9	<i>HPLC-Analyse der Nucleotide</i>	134
5.6.10	<i>Phosphotransferasereaktion</i>	135
5.6.11	<i>Bestimmung der dNTP-Konzentrationen</i>	136
5.7	<i>Biologische Experimente</i>	137
5.7.1	<i>Drosophila melanogaster-Anzucht und Embryonenernte</i>	137
5.7.2	<i>Proteinexpression während der D. melanogaster-Entwicklung</i>	137
5.7.3	<i>Erfassung des Entwicklungsprofils</i>	138
5.7.4	<i>Embryonenextraktpräparation</i>	138
5.7.5	<i>Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen</i>	139
5.7.6	<i>Ovarienpräparation und Färbung</i>	140
5.7.7	<i>DNA- und RNA-Extraktion aus D. melanogaster</i>	140
5.7.8	<i>UV-Belastungsexperiment mit L2-Larven</i>	141
Anhang		142
A.1	Zusätzliche Daten	142
	I. Abbildungen	142
	II. Tabellen	150
A.2	Abkürzungen	155
A.3	Literaturverzeichnis	157
A.4	Danksagung	172
A.5	Eidesstattliche Erklärung	173
A.6	Lebenslauf	174
A.7	Publikationsliste	175

2 Einleitung

Der Stoffwechsel eines Organismus wird gestaltet durch ein komplexes Wechselspiel von katabolen und anabolen Prozessen. Katabole Reaktionen sind abbauende Prozesse, die auch biologisch nutzbare Formen von Energie erzeugen können, währenddessen anabole Reaktionen diese Energie wieder verbrauchen, um komplexe Strukturen aus einfachen Bausteinen aufzubauen. Diese Prozesse sind oftmals nicht einfach Hin- und Rückreaktion, sondern werden durch verschiedene Enzyme katalysiert. Hierbei ist deren Aktivität, Lokalisation und Konzentration entscheidend. Durch eine hochgradige Vernetzung der einzelnen Stoffwechselwege untereinander kann sehr schnell auf Veränderungen im Metabolismus reagiert und die lebenswichtigsten Funktionen können aufrechterhalten werden. Dazu gehören die grundlegende Versorgung aller Zellen mit Metaboliten und Energie, aber auch der Abbau und das Ausschleusen zellschädigender Substanzen.

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung einer Enzymfamilie aus dem Bereich des Nukleotidstoffwechsels: Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen (NT5C) sind Enzyme, die spezifisch den Abbau von 5'-Nukleosidmonophosphaten (5'-NMPs) zu ihren Nukleosiden (Ns) und Orthophosphat (Pi) katalysieren (s. Abb. 2.1).

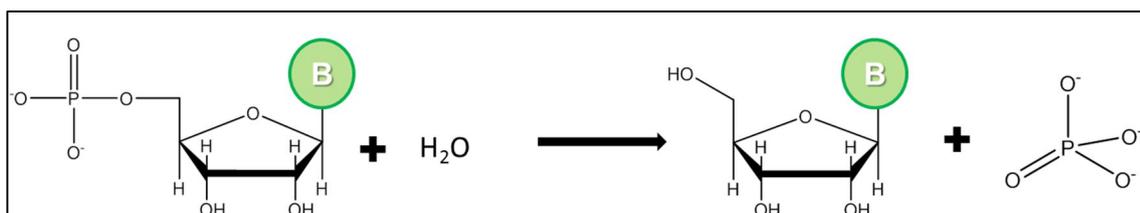


Abb. 2.1 Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen katalysieren den Abbau von 5'-Nukleosidmonophosphaten zum korrespondierenden Nukleosid und Orthophosphat.

Die 5'-NMPs entstehen hauptsächlich durch den Abbau von Ribonukleinsäuren (RNA), wie den *messenger* RNAs (mRNAs) und ribosomalen RNAs (rRNAs), aber auch durch den Verbrauch von energiereichen Nukleotiden, wie Adenosintriphosphat (ATP) oder Guanosintriphosphat (GTP), und als Intermediate während der Nukleotidsynthese.

Humane 5'-Nukleotidasen wurden bereits umfangreich untersucht, jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit noch eine weitere humane zytosolische 5'-Nukleotidase

identifiziert, die spezifisch ein modifiziertes 5'-NMP als Substrat erkennt, N7-methyliertes Guanosinmonophosphat (m⁷GMP). Innerhalb dieser Arbeit wurden auch erstmalig Untersuchungen zu zytosolischen 5'-Nukleotidasen aus *Drosophila melanogaster* durchgeführt.

2.1 Die Familie der 5'-Nukleotidasen – eine Übersicht

Die 5'-Nukleotidasen (5'-Nukleosidmonophosphat-Phosphohydrolasen; EC 3.1.3.5) wurden bereits 1934 das erste Mal erwähnt und seitdem in vielen Organismen untersucht, jedoch noch nicht in *Drosophila melanogaster* (Ipata und Balestri 2013; Reis M. J. 1934). In Säugern wurden bis jetzt sieben 5'-Nukleotidasen identifiziert (Itoh 2013; Zimmermann et al. 2012; Hunsucker et al. 2005; Zimmermann 1992). Dabei handelt es sich um eine extrazelluläre 5'-Nukleotidase und sechs zellulär lokalisierte 5'-Nukleotidasen (Tab. 2.1). Ein Vertreter der zytosolischen 5'-Nukleotidasen ist zudem in den Mitochondrien lokalisiert.

Außer in der Lokalisation unterscheiden sich die 5'-Nukleotidasen auch in ihrer Substratspezifität, sowie in ihrer Regulation und gewebespezifischen Expression. Außerdem weisen 5'-Nukleotidasen untereinander eine geringe Primärsequenzhomologie auf (Bianchi und Spsychala 2003). Die sechs zytosolischen 5'-Nukleotidasen gehören der HAD (*haloacid dehalogenase*)-Superfamilie an, sind magnesiumabhängig und beinhalten das Konsensusmotiv [Asp-Xxx-Asp-Xxx-(Thr/Val/Cys)] im aktiven Zentrum.

Die ektosolische 5'-Nukleotidase (NT5E) hingegen gehört zur Calcineurinsuperfamilie (Zimmermann et al. 2012). Dieses Enzym ist eine zinkabhängige Metallophosphatase (Koonin und Tatusov 1994). In der Regel wird sie mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker versehen und ist damit ein plasmamembrangebundenes Enzym. Es wurden jedoch auch lösliche Varianten im Ektosol nachgewiesen (Ogata et al. 1990).

Tab. 2.1 Übersicht identifizierter 5'-Nukleotidasen in Säugern. Zusammengetragen aus den Review-Artikeln von Zimmermann et al. 2012; Hunsucker et al. 2005 und Zimmermann 1992.

Familie	Bevorzugte Substrate	Gewebe-lokalisierung	Pi-Transfer
Zytosolische 5'-Nukleotidase (NT5C)			
1A	5'-AMP, 5'-dNMPs	Muskel, Herz, Gehirn	
1B	5'-AMP	Hoden	
2	5'-(d)IMP, 5'-(d)GMP, 5'-XMP	Ubiquitär	Ja
3	5'-(d)CMP, 5'-(d)UMP	Erythrozyten	Ja
Desoxynukleotidase (dNT5C)	3'-dUMP, 3'-dTMP, 3'-UMP, 2'-UMP, 5'-dNMPs	Ubiquitär	Ja
Mitochondriale (mdNT5C)	5'-dUMP, 5'-dTMP	Ubiquitär	
Ektosolische 5'-Nukleotidase (NT5E)			
	5'-AMP, 5'-NMPs, 5'-dNMPs	Ektosol	

Die ektosolische 5'-Nukleotidase der Säuger weist die höchste Spezifität für 5'-AMP auf (Zimmermann et al. 2012; Sträter 2006; Zimmermann 1992). Die Hauptfunktion der NT5E ist die Produktion von extrazellulärem Adenosin, welches dann als Signalmolekül wirksam wird und an spezifische G-Protein-gekoppelte P1-Rezeptoren binden kann (Sträter 2006; Zimmermann 2000, 1992). Zusätzlich sorgt die NT5E dafür, dass externe Nukleotide wiederverwertet werden können, indem es diese in Nukleoside überführt. Anschließend können die Nukleoside durch spezifische Nukleosidtransporter in die Zelle aufgenommen werden (King et al. 2006). Da der Fokus dieser Arbeit auf den zytosolischen 5'-Nukleotidasen lag, wird auf das ektosolische Enzym im weiteren Verlauf nicht näher eingegangen.

2.2 Der Nukleotidstoffwechsel

5'-Nukleotidasen sind Enzyme des Nukleotidstoffwechsels und sind damit vermutlich an der Homöostase des intrazellulären Nukleotidpools beteiligt. Im Folgenden werden der Nukleotidstoffwechsel, sowie Defekte innerhalb dieses Stoffwechselweges und die Position der 5'-Nukleotidasen in diesem komplexen Netzwerk zusammengefasst.

2.2.1 Homöostase des intrazellulären Nukleotidpools

Nukleotide sind Bausteine für die lebensnotwendige Nukleinsäurebiosynthese und sind für den Energiehaushalt und viele weitere Prozesse in der Zelle wichtig. Sie werden ständig in der Zelle umgesetzt, daher ist das Bereitstellen von Nukleotidbausteinen essentiell. Auf- und Abbau der Nukleotide werden durch eine Vielzahl von Enzymen bewerkstelligt und die Homöostase des zellulären Nukleotidpools dadurch an vielen Punkten reguliert (Berg et al. 2011). So ist der Nukleotidstoffwechsel im Menschen einer der umfangreichsten Stoffwechselwege mit bis zu 204 beteiligten Enzymen (KEGG Datenbank, Kanehisa et al. 2014; Kanehisa und Goto 2000). Die Bereitstellung von Nukleotiden in Form von Nukleosidtriphosphaten (NTPs) kann entweder durch die *De-Novo*-Synthese erfolgen oder durch das Wiederverwerten dephosphorylierter Nukleotide (Recycling).

Ist es notwendig den Nukleotidvorrat zu verringern, können Nukleotide auch abgebaut werden und zwar in Produkte, die der Organismus leicht ausscheiden kann, wie beispielsweise Harnstoff oder Allantoin. Hierfür ist der Abbau der Nukleotide durch Phosphatasen und die 5'-Nukleotidasen zu Nukleosiden unumgänglich. Störungen in den Abbauwegen können zu schweren physiologischen Defekten führen.

2.2.1.1 *De-Novo*-Synthese

Bei der *De-Novo*-Synthese werden durch eine Vielzahl von Enzymen einfache Metabolite, wie beispielsweise Aminosäuren und Kohlenstoffdioxid, sukzessive zu Nukleosidmonophosphaten aufgebaut (Berg et al. 2011). Die synthetisierten 5'-NMPs werden dann durch spezifische 5'-NMP-Kinasen unter Verbrauch eines ATPs zu Nukleosiddiphosphaten (NDPs) phosphoryliert (s. Abb. 2.2). Durch den Verbrauch weiteren ATPs und durch eine unspezifische NDP-Kinase erfolgt die sukzessive Phosphorylierung der NDPs zu NTPs, sehr energiereichen Verbindungen mit hohem Phosphorylgruppenübertragungspotential. Die Stufe der NDPs ist außerdem Ausgangspunkt für die Synthese der Desoxynukleotide, die zum Aufbau der DNA benötigt werden. Diese Reaktion wird durch die Ribonukleotidreduktase katalysiert.

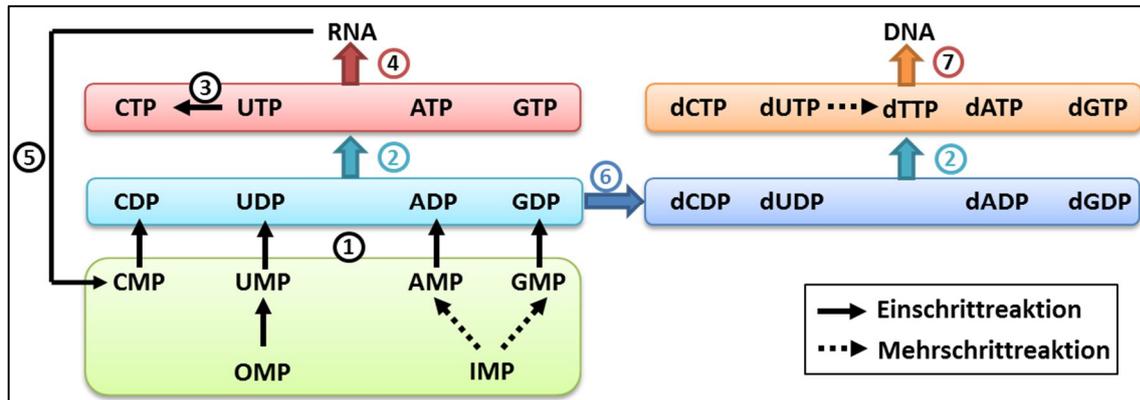


Abb. 2.2 Schematische Darstellung zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten und Desoxynucleosidtriphosphaten aus 5'-Nucleosidmonophosphaten durch sukzessive kinasekatalysierte Phosphorylierungen. 1, spezifische 5'-NMP-Kinasen; 2, unspezifische NDP-Kinase, 3, CTP-Synthase; 4, RNA-Polymerase; 5, Exo- und Endonukleasen; 6, Ribonucleotidreduktase; 7, DNA-Polymerase.

Anzumerken ist hierbei, dass Nucleoside weder Vorläufer noch Zwischenstufen der *De-novo*-Synthese sind. Für die Synthese jedes 5'-NMPs wird eine Einheit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) verbraucht (Berg et al. 2011). Dieses PRPP-Molekül stellt bereits den 5'-Phosphat-Ribose-Anteil des zu synthetisierenden Nucleotides.

2.2.1.2 Recycling

Neben der Neusynthese ist auch die Wiederverwertung von Nucleosiden eine Möglichkeit NTPs zu erzeugen. Die *De-Novo*-Synthese von Nucleotiden ist energetisch betrachtet sehr kostspielig. Durch das Wiederverwerten von Nucleotidvorläufern, wie Nucleosiden und Nucleobasen, können bis zu 6 Energieeinheiten eingespart werden (Summe der verbrauchten ATP- und GTP-Einheiten für die Synthese eines Adenylates vom Phosphoribosylamin, Berg et al. 2011).

In der Zelle entstehen Nucleoside durch die Aktivität zytosolischer 5'-Nucleotidasen (s. Abb. 2.1). Als Nucleoside können diese Moleküle mit Hilfe verschiedener Nucleosidtransporter Zellmembranen überwinden und beispielsweise frei im Blut transportiert werden (King et al. 2006; Kong et al. 2004). Damit Nucleoside dort, wo sie gebraucht werden, wiederverwertet werden können, muss die Ribose durch Phosphorylasen abgespalten werden (s. Abb. 2.3, Berg et al. 2011). Es entstehen Nucleobasen, die nun durch spezifische Phosphoribosyltransferasen unter Verbrauch

von PRPP zu 5'-NMPs aufgebaut werden. Durch die oben genannten Nukleotidkinasen werden die 5'-NMPs wieder zu NTPs phosphoryliert. Der Recyclingprozess ist insbesondere für Zellen wichtig, die eine limitierte *De-Novo*-Synthese aufweisen, wie beispielsweise Nervenzellen des Gehirns und rote Blutzellen (Ipata et al. 2011).

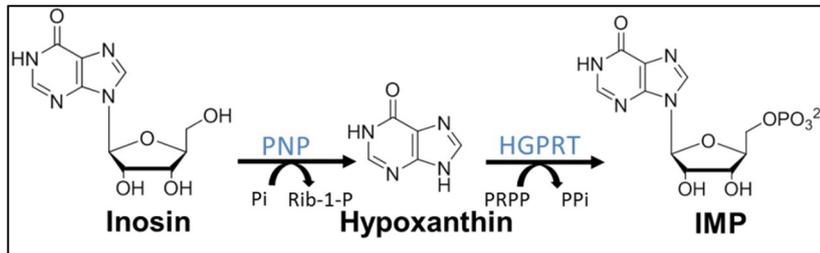


Abb. 2.3 Prozess des Recyclings von Nucleotiden am Beispiel von Inosin. Das Endprodukt 5'-IMP kann anschließend wieder zur Synthese der Purinnucleotide 5'-AMP und 5'-GMP genutzt werden. Pi, Orthophosphat; Rib-1-P, Ribose-1-Phosphat; PNP, Purinnucleosidphosphorylase; PRPP, Phosphoribosylpyrophosphat; PPi, Pyrophosphat; HGPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

Eine Ausnahme ist hierbei das Adenosin. Als Vorläufermolekül von ATP ist es besonders wichtig für die Zelle und kann als einziges Nucleosid direkt durch eine Adenosin-spezifische Kinase zu 5'-AMP phosphoryliert werden (Rana et al. 2015). Jedoch wird hierfür auch wieder eine Einheit ATP verbraucht. Eine weitere Variante 5'-AMP zurückzugewinnen ist die Desaminierung des Adenosins durch eine Deaminase zu Inosin (Latini und Pedata 2001). Das Inosin kann dann durch die Enzyme des Recyclingweges wieder zu 5'-Inosinmonophosphat (5'-IMP) phosphoryliert werden. Die Enzyme der *De-Novo*-Purinsynthese katalysieren anschließend den Umbau von 5'-IMP über Adenylosuccinat zum 5'-AMP (Berg et al. 2011).

Die über Nahrung aufgenommenen Nucleinsäuren sind ebenfalls eine Nucleotidversorgungsquelle. Durch das Zusammenspiel von extrazellulären Nucleasen, Phosphodiesterasen und Nucleotidasen können Nucleinsäuren aus der Nahrung zu Nucleosiden abgebaut werden. In dieser Form können sie über konzentrierende Nucleosidtransporter (*concentrative nucleoside transporters*, CNTs) in die Zelle importiert werden (Young et al. 2013). Dort ermöglichen die Enzyme des Recyclingweges dann die Aufarbeitung zu Nucleosidtriphosphaten.

2.2.1.3 Nukleotidabbau

Der Abbau der Nukleotide wird initiiert durch deren Dephosphorylierung durch die 5'-Nukleotidasen (s. Abb. 2.4, Berg et al. 2011). Anschließend wird die Riboseeinheit der entstandenen Nukleoside durch spezifische Nukleosidphosphorylasen entfernt. Bei dem Purin Adenosin erfolgt zuvor die Umwandlung zum Inosin durch die Adenosindeaminase. Als Nukleosid, bzw. als Nukleobase können diese Nukleotidbausteine frei im Körper transportiert werden, insbesondere zur Leber und der Niere, den wichtigsten Organen im Nukleotidabbau (Voet und Voet 2004). Die Purine werden dort durch die Xanthinoxidase oxidiert (s. Abb. 2.4, Krenitsky et al. 1986). Aus Guanin und Hypoxanthin entsteht so Xanthin, welches weiter zur Harnsäure umgesetzt wird. Im Menschen und Primaten wird die Harnsäure anschließend durch equilibrierende Nukleosidtransporter (*equilibrative nucleoside transporters*, ENTs) in der Niere mit dem Harn ausgeschieden (Elwi et al. 2006). Die Pyrimidine werden über Reduktionsvorgänge und daraus folgende Ringöffnung abgebaut (Voet und Voet 2004). Beispielsweise wird Uracil durch Reduktion unter Verbrauch von NADPH/H⁺ vollständig zu β -Alanin, CO₂ und Ammoniak zerlegt. Thymin hingegen wird zu β -Aminoisobutyrat umgewandelt (s. A.1.1.1).

Störungen im Purinabbauweg führen zu schweren pathologischen Defekten. Beispielsweise führt der Ausfall der oben genannten Adenosindesaminase zu schweren kombinierten Immundefekten (*severe combined immune deficiency*, SCID), die durch einen erhöhten dATP-Spiegel und den Verlust von T-Zellen verursacht werden (Sauer et al. 2012; Buckley et al. 1997; Hirschhorn et al. 1992). Auch eine Verminderung der Xanthinoxidaseaktivität durch ansteigende Inosinkonzentrationen kann zu den obengenannten Defekten beitragen. Ist nur die Aktivität der Xanthinoxidase vermindert, akkumuliert Xanthin im Körper und es können sich Xanthinkristalle bilden, die im schlimmsten Fall zu Nierenversagen führen können.

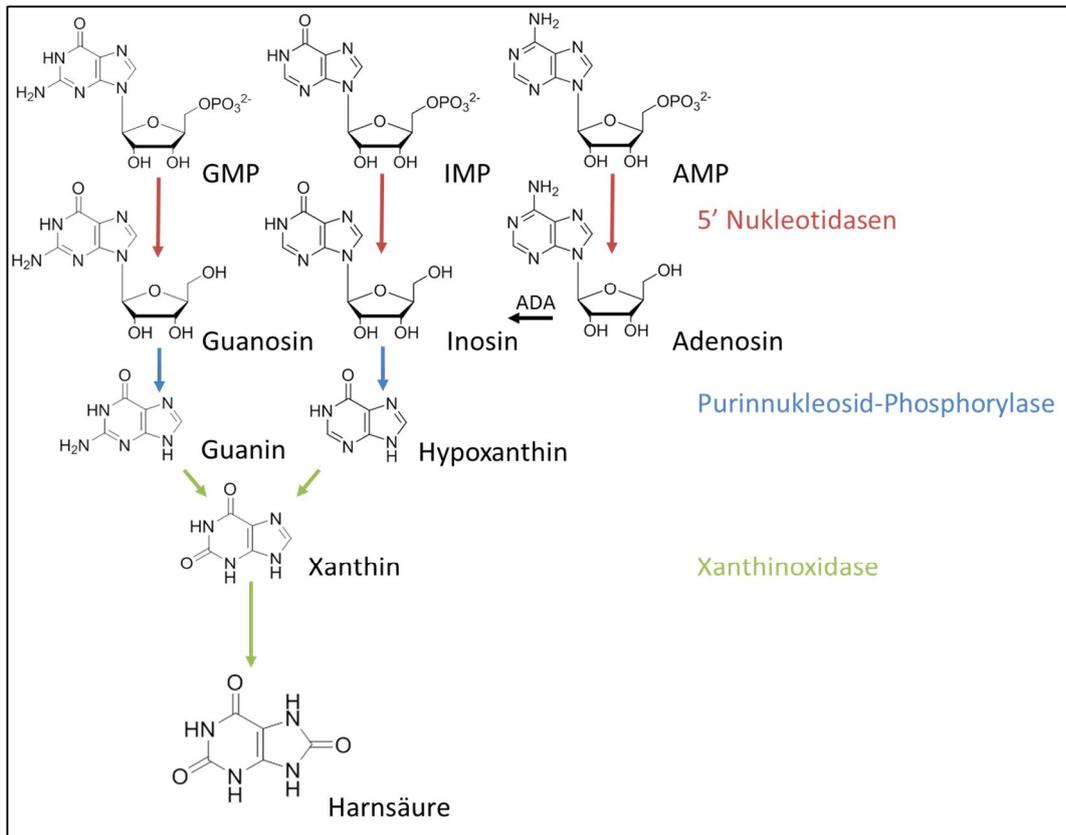


Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Purinnukleotidabbaus. ADA, Adenosindeaminase.

Ein anderes Phänomen ist das Auftreten hoher Uratkonzentrationen, was häufig durch Ausscheidungsstörungen der Niere, aber auch durch eine Überproduktion von Urat hervorgerufen wird. Urat akkumuliert u.a. wenn die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoriboyltransferase (HGPRT)-Aktivität vermindert ist (Sculley et al. 1992; Davidson et al. 1989). Hohe Uratkonzentrationen sind verantwortlich für das Auftreten von Gichtbeschwerden, da das überschüssige Urat besonders in Gelenken auskristallisiert und dort Entzündungen verursacht (Berg et al. 2011). Eine schwere neurologische Störung, das Lesch-Nyhan-Syndrom, wird durch den vollständigen Verlust der HGPRT ausgelöst (Fu et al. 2014). Vermutlich werden die Symptome, autoaggressives Verhalten sowie kognitive Beeinträchtigungen, nicht nur von den ansteigenden Uratkonzentrationen hervorgerufen. Es wird diskutiert, dass hierfür auch eine mangelnde Versorgung der Nervenzellen mit Nukleotiden in Betracht zu ziehen ist (Deutsch et al. 2005; McCreanor und Harkness 1995). Wie bereits erwähnt, sind

insbesondere Gehirnzellen abhängig vom Nukleotidrecycling. Durch das Fehlen der HGPRT kommt es zur Unterversorgung mit 5'-GMP und 5'-IMP.

2.2.2 Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen im Nukleotidstoffwechsel

In der Theorie können 5'-Nukleotidasen im Nukleotidstoffwechsel zwei Funktionen besitzen. Zum einen haben sie offensichtlich eine katabolische Funktion beim Nukleotidabbau und befreien die Zelle somit von überschüssigen Nukleotiden, zum anderen bieten sie jedoch auch die Möglichkeit die Regulation der 5'-NMP-Konzentration im Zytosol zu verbessern (Ipata und Balestri 2013). Diese Regulationsmöglichkeit ist durch die Existenz sogenannter Substratzyklen gegeben. Substratzyklen bestehen immer aus katabolen wie auch anabolen Prozessen, so dass beim Durchlaufen eines Zyklus Energie verbraucht wird, jedoch kein neues Molekül entsteht (Newsholme et al. 1983). Sie werden daher auch *futile cycles* genannt (Voet und Voet 2004). Der einfachste Substratzyklus besteht aus zwei verschiedenen Enzymen. Ein prominentes Beispiel ist hierfür die Hexokinase und die Glucose-6-Phosphatase (Jungermann et al. 1982). Es wurden jedoch auch viel größere Substratzyklen identifiziert mit über 100 Schritten (Gebauer et al. 2012).

Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen bilden zusammen mit den Enzymen des Recyclingweges einen Substratzyklus (s. Abb. 2.5; Hunsucker et al. 2005; Gazzola et al. 2001). Dadurch wird z. Bsp. die Konzentration von 5'-IMP durch die katalytischen Parameter dreier Enzyme eingestellt. Zusätzlich wird die 5'-IMP-spezifische Nukleotidase 2 (NT5C2) durch ATP allosterisch aktiviert, so dass die 5'-IMP-Konzentration auch an den Energiestatus der Zelle gekoppelt wird. Die 5'-AMP-spezifische Nukleotidase 1 (NT5C1) ist sogar in zwei Substratzyklen eingebunden (s. Abb. 2.5; Bontemps et al. 1983): zum einen zusammen mit den Recyclingenzymen und zum anderen mit der bereits erwähnten Adenosinkinase. Dadurch wird die zytosolische 5'-AMP-Konzentration sehr fein modulierbar. Das ist physiologisch relevant, da insbesondere 5'-AMP ein wichtiger Bestandteil des Energiemetabolismus ist und nicht zuletzt auch selbst als Regulator wichtiger Stoffwechselwege wirkt (z.B. als Regulator der Phosphofruktokinase, Brüser et al. 2012). Beide Substratzyklen zusammen tragen damit indirekt auch zur Balance

der zellulären NTP- und dNTP-Pools bei, da 5'-AMP der Vorläufer von ATP ist, dem wichtigsten Donor für die Phosphorylgruppen der Nucleosidtriphosphate (Dzeja und Terzic 2009).

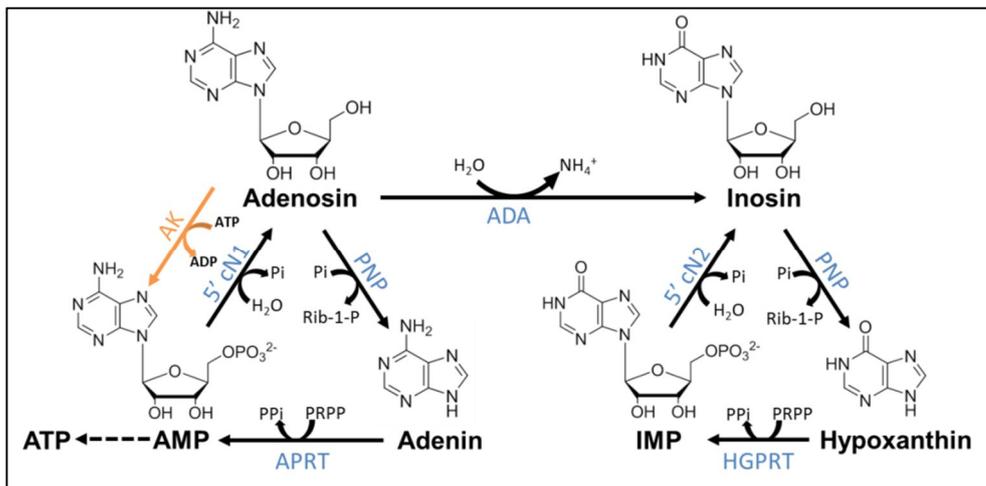


Abb. 2.5 Schematische Darstellung einiger Substratzyklen des Purinmetabolismus und ihrer Kopplung. AK, Adenosinkinase; cN1, zytosolische 5'-Nucleotidase 1; PNP, purinspezifische Phosphorylase; APRT, Adenylphosphoribosyltransferase; ADA, Adenosindeaminase; cN2, zytosolische 5'-Nucleotidase 2; HGPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

2.3 Struktur bedingt Katalyse

2.3.1 Strukturmerkmale der zytosolischen 5'-Nucleotidasen

Strukturell werden die zytosolischen 5'-Nucleotidasen der HAD-Superfamilie zugeordnet, die sich von dem Enzym Haloacid-Dehalogenase (EC 3.8.1.9) ableitet (Burroughs et al. 2006). Die Enzyme der HAD-Familie katalysieren mit Hilfe eines Aspartatrestes im aktiven Zentrum Transferreaktionen, hauptsächlich von Phosphorylgruppen auf verschiedenste Substrate. Dieser Familie gehören auch die P-Typ-ATPase, die CTD-Phosphatase und die β -Phosphoglucomutase an (Koonin und Tatusov 1994).

Die Tertiärstruktur der HAD-Enzyme wird durch eine Kerndomäne und eine *cap*-Domäne definiert (s. Abb. 2.6). Hierbei hat die Kerndomäne eine sandwichartige Struktur aus α -Helices und parallelen β -Strängen, die eine Rossmann-ähnliche Faltung ausbilden. Die Rossmann-Faltung ist eine häufig vorkommende Strukturdomäne, die

sich speziell zur Bindung von Nukleotiden entwickelt hat. In diesem Bereich befinden sich auch die direkt an der Katalyse beteiligten Motive I-III. Außerdem beinhaltet diese Domäne noch zwei weitere, kleinere Strukturmerkmale: das *squiggle*-, eine nahezu komplette, einfache α -helikale Windung, und das *flap*-Element, einen β -*hairpin turn* (Burroughs et al. 2006).

Die *cap*-Domäne der zytosolischen 5'-Nukleotidasen erlaubt deren Zuordnung zu den C1-*cap*-beinhaltenden HAD-Proteinen. Innerhalb dieser *cap*-Domäne kommt es zu hoher Variabilität unter den 5'-Nukleotidasen. Es wurde gezeigt, dass insbesondere diese Domäne Aminosäurereste zur Erkennung des Substrates bereitstellt (als Motiv S definiert) und damit die Spezifität des Enzyms bestimmt (Walldén und Nordlund 2011; Walldén et al. 2007; Rinaldo-Matthis et al. 2002; Wang et al. 2002). Die *cap*-Domäne ist außerdem recht beweglich, so dass das Enzym zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation wechseln kann (Allen und Dunaway-Mariano 2004; Morais et al. 2000). Durch Strukturanalysen der ^{Mm}cN3A wurde außerdem gezeigt, dass auch das *squiggle*- und das *flap*-Element eine hohe Flexibilität vermitteln und somit ebenfalls den Konformationswechsel ermöglichen (Grobosky et al. 2012). In der offenen, katalytisch inaktiven Konformation besitzt die Kerndomäne eine große Vertiefung um den Bereich des aktiven Zentrums, so dass dieses frei zugänglich für das umgebende Lösungsmittel ist (Grobosky et al. 2012). Während der Substratbindung bleibt die Kerndomäne in ihrer Konformation nahezu unverändert. Die *cap*-Domäne (C1-*cap*) hingegen durchläuft eine leichte Bewegung nach unten zur Kerndomäne hin und schließt somit das aktive Zentrum vom umgebenden Lösungsmittel ab (Grobosky et al. 2012). Dies führt zu einem kompletten Einschluss des Substrates, und die Katalyse kann nun unabhängig vom umgebenden Lösungsmittel stattfinden. Durch die Bindung wird zudem eine Konformationsänderung ausgelöst, die zur Folge hat, dass das Substrat optimal im aktiven Zentrum gebunden wird. Diese Protein-Substrat-Wechselwirkung entspricht also dem *induced-fit* Modell.

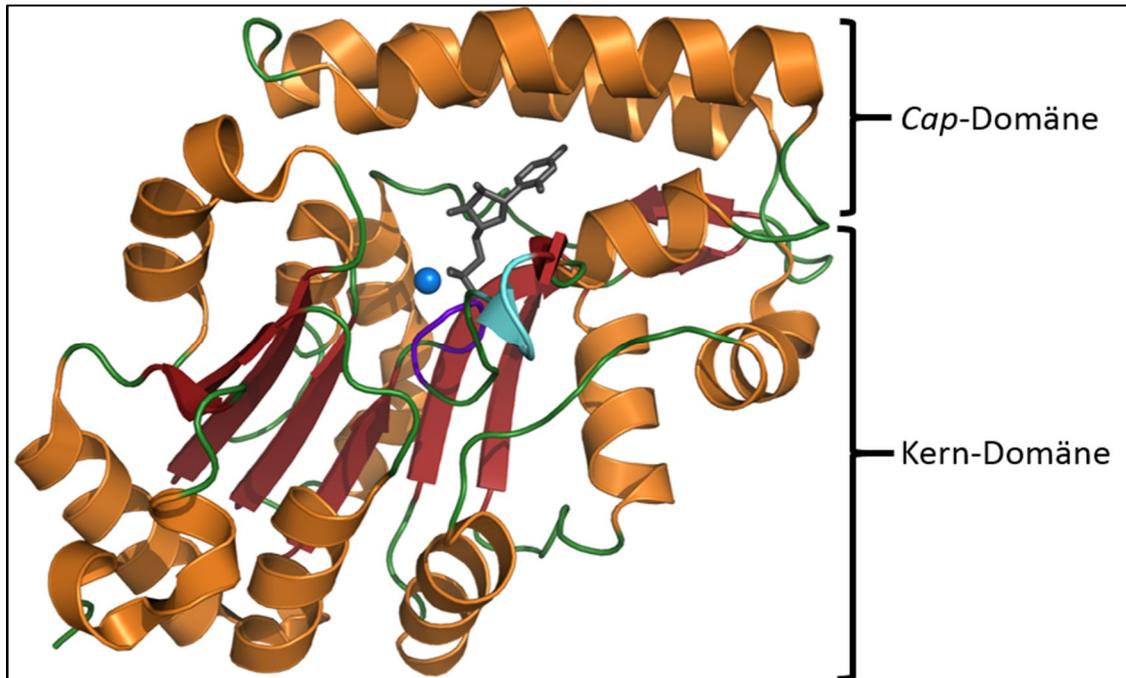


Abb. 2.6 Struktur der murinen cN3A mit dem Substrat 5'-UMP im aktiven Zentrum. Die Abbildung wurde mit dem PDB-Eintrag 4FE3 mit dem Programm Pymol® erstellt. 5'-UMP (grau) und ein Magnesiumion (marineblau) befinden sich im aktiven Zentrum des Enzyms im Bereich der Kerndomäne. Das aktive Zentrum wird durch die *cap*-Domäne vom umgebenden Lösungsmittel abgetrennt. α -Helices, orange; β -Faltblätter, rot; *loop*-Regionen, grün; *squiggle*-Element, lila; *flap*-Element, cyan.

Das aktive Zentrum der 5'-Nukleotidasen besitzt hohe Ähnlichkeit mit dem aktiven Zentrum der Phosphoserinphosphatase (Collet et al. 1998a). In der Substraterkennungstasche werden die bindenden Nukleotide, die eine planare, hydrophobe Ringstruktur aufweisen, zwischen aromatischen Aminosäureseitenketten platziert. Dadurch entsteht ein hydrophober Käfig um das Substrat (Grobosky et al. 2012). Diese Art der Bindung von Nukleotiden wird auch bei *cap*-bindenden Proteinen beobachtet, wie z.B. bei dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E, sowie beim nukleären *cap*-bindenden Proteinkomplex CBC (Calero et al. 2002). Die Aminosäureseitenketten werden dabei so koordiniert, dass ein hydrophober „Stapel“ entsteht, *hydrophobic stacking* genannt. Dabei wird das *stacking* durch die π -Elektronen der Ringsysteme ermöglicht. Insbesondere ein leicht von der Mitte verschobenes (*off-centered*), parallelversetztes π -Elektronen-*stacking* erweist sich als favorisierte Konformation (McGaughey et al. 1998).

2.3.2 Gemeinsamer Katalysemechanismus

Um die Dephosphorylierung eines 5'-NMPs zu katalysieren, muss zunächst ein Magnesiumion im aktiven Zentrum der zytosolischen 5'-Nukleotidasen binden. Das Magnesiumion wird dabei oktahedral koordiniert und ist ein wichtiger Cofaktor der Katalysereaktion (Grobosky et al. 2012; Rinaldo-Matthis et al. 2002). Zum einen wird es durch die Carboxylgruppen der an der Katalyse beteiligten Aspartate des Motivs I und Motivs III und zwei benachbarte Wassermoleküle koordiniert, und zum anderen stabilisiert es die negative Ladung des Phosphates des 5'-NMPs.

Tab. 2.2 Die Aminosäuremotive, die für die katalytische Aktivität der zytosolischen 5'-Nukleotidasen maßgeblich sind (Walldén et al. 2007). Ein x steht für eine beliebige Aminosäure.

Motiv	Sequenz
I	DxDx(T/V/C)(L/V)
II	(T/S)
III	K(G/S)(D/S) _{x0-4} (D/N)
S	Variabel

Nach Bindung des Substrates kommt es zunächst zu einem nukleophilen Angriff des ersten Aspartates aus Motiv I auf die 5'-Phosphatgruppe des gebundenen 5'-NMPs (s. Abb. 2.7; s. Tab 2.2). Das zweite Aspartat aus Motiv I sorgt dann für eine Protonierung des entstandenen Nukleosids, welches anschließend das aktive Zentrum verlassen kann (Rinaldo-Matthis et al. 2002). Hierbei wechselt das Enzym in die oben beschriebene offene Konformation. Es entsteht an diesem Punkt ein kovalentes Phosphoenzymintermediat, d.h. das Phosphat ist über eine Säureanhydridbindung mit dem ersten Aspartat des Motivs I verknüpft (Allegrini et al. 2001; Collet et al. 1998b). Die offene Enzymkonformation ermöglicht gleichzeitig das erneute Vordringen des umgebenden Lösungsmittels bis zum aktiven Zentrum. Dadurch wird die hydrolytische Spaltung des Phosphoenzymintermediates durch den Angriff eines Wassermoleküls ermöglicht. Das Phosphat kann nun das Enzym verlassen. Durch die Bindung eines weiteren 5'-NMPs beginnt die Katalysereaktion erneut.

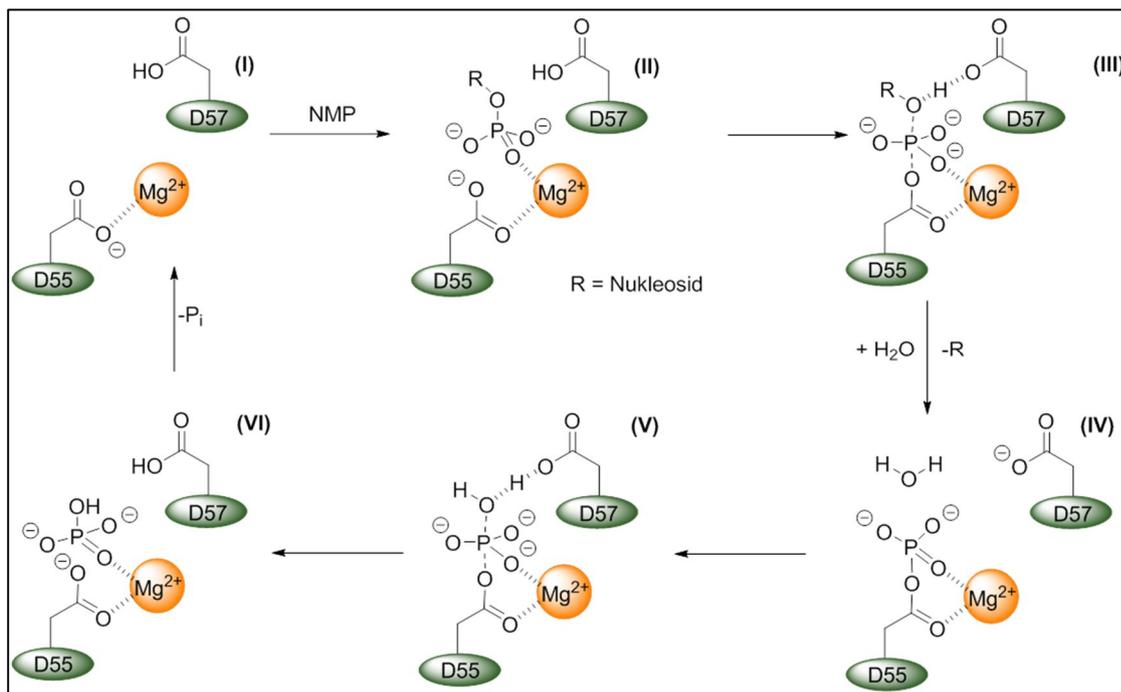


Abb. 2.7 Katalysemechanismus der zytosolischen 5'-Nukleotidasen. Während der Katalysereaktion wird ein kovalentes Phosphoenzymintermediat gebildet (IV). Modifizierte Abbildung aus Bitto et al. 2006.

Enzymkinetisch handelt es sich hierbei um einen sequenziell geordneten Reaktionsablauf, erst wird das Nucleosid freigesetzt, dann das Phosphat (Bitto et al. 2006). Neben dem Motiv I konnten über die Zeit weitere Motive identifiziert werden, die ebenfalls zu einer effizienten Katalyse beitragen (s. Tab. 2.2). Das Motiv II stellt einen Threonin- bzw. Serin-Rest innerhalb einer hydrophoben Region zur Verfügung, und sorgt damit für eine korrekte Orientierung des Substrates innerhalb des aktiven Zentrums durch Wasserstoffbrückenbindungen (Allegrini et al. 2004). Das Motiv III besitzt einen Lysinrest und weitere Aspartatreste, die für die Stabilisierung des negativ geladenen Intermediates und des Magnesiumions verantwortlich sind. Dies wurde durch Kristallstrukturanalysen der mitochondrialen 5'-Nukleotidase (PDB-ID: 1MH9) bewiesen (Rinaldo-Matthis et al. 2002; Wang et al. 2002). Durch diese Kristallstruktur konnte auch eine eindeutige Zuordnung der zytosolischen 5'-Nukleotidasen zur HAD-Superfamilie erfolgen. Es wurde auch gezeigt, dass manche zytosolischen 5'-Nukleotidasen das Phosphat des Phosphoenzymintermediates wieder zurück auf ein Nucleosid übertragen können, vorausgesetzt das Nucleosid befindet sich in hoher Konzentration im Lösungsmittel (Amici et al. 1997; Pesi et al. 1994). Dieser

Phosphotransferaseaktivität konnte bis jetzt jedoch keine physiologische Relevanz nachgewiesen werden.

2.4 Die humanen 5'-Nukleotidasen 2 und 3A

Innerhalb der vorgelegten Arbeit wurden u.a. Homologe der humanen 5'-Nukleotidasen cN2 und cN3A in *D. melanogaster* untersucht. Im nächsten Abschnitt werden daher diese zwei humanen Enzyme im Detail vorgestellt, sowie ihre physiologische Funktion im Menschen und ihre klinische Relevanz erläutert.

2.4.1 Die zytosolische 5'-Nukleotidase 2

Die zytosolische 5'-Nukleotidase 2 (cN2, NT5C2) dephosphoryliert bevorzugt 6-Hydroxypurinnukleotide, wie beispielsweise 5'-IMP, 5'-GMP und deren Desoxyvarianten und ist bereits 1967 entdeckt worden (Itoh 2013; Itoh et al. 1967). Die cN2 ist auch als *high* K_M -Nukleotidase bekannt, da sie im Gegensatz zu anderen 5'-Nukleotidasen K_M -Werte für ihre Substrate im Millimolaren-Bereich aufweist (Bretonnet et al. 2005).

Die Primärsequenz der cN2 ist bemerkenswert hoch konserviert. So besitzen Homologe aus Mensch zu *Legionella pneumophila* eine Identität von 31% und zu *Drosophila melanogaster* eine Identität von 70% (*pubmed blast search*, ^{Hs}cN2: NP001127845; ^{Lp}cN2: YP006507263 und ^{Dm}cN2: NP996509). Die mRNA der zytosolischen Nukleotidase 2 ist in allen Geweben nachweisbar, so dass eine ubiquitäre Expression wahrscheinlich ist (Ipata und Tozzi 2006). Die zytoplasmatische Lokalisierung ist durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen worden (Yokota et al. 1988). Das Protein ist weder im Nukleus, noch in den Mitochondrien, Peroxisomen oder im endoplasmatischen Retikulum detektiert worden. Die cN2 wird in evolutionär jüngeren Organismen besonders stark in Geweben mit hoher DNA-Syntheserate und hohem RNA-Umsatz exprimiert, wie in Milz, Hoden und lymphoblastischen Zellen (Itoh 1993; Itoh und Yamada 1991; Madrid-Marina 1990; Sychała et al. 1988). Ein

niedrigeres Expressionslevel weisen hingegen Gewebe mit geringerer Zellteilungsrate auf, wie beispielsweise Gewebe des Gehirns und die Herz- oder Skelettmuskeln.

Durch Bestimmung des nativen Molekulargewichtes durch Gelfiltration und Ultrazentrifugation wurde für die cN2 eine tetramere Struktur angenommen (Itoh 1993; Sychała et al. 1988; Naito und Tsushima 1976). Die tetramere Form wurde später auch durch Kristallstrukturanalysen belegt (s. Abb. 2.8; Walldén et al. 2007; PDB-ID: 2XCV). Es wurde außerdem gezeigt, dass die cN2 nur als Oligomer aktiv ist, mit dem Dimer als der kleinsten „katalytisch-aktiven“ Einheit, da eine Dimerisierung für die Nukleotidbindung notwendig ist (Pesi et al. 2010). Der Katalysemechanismus entspricht dem allgemeinen Mechanismus der zytosolischen 5'-Nukleotidasen (s. 2.3.2; Allegrini et al. 2001).

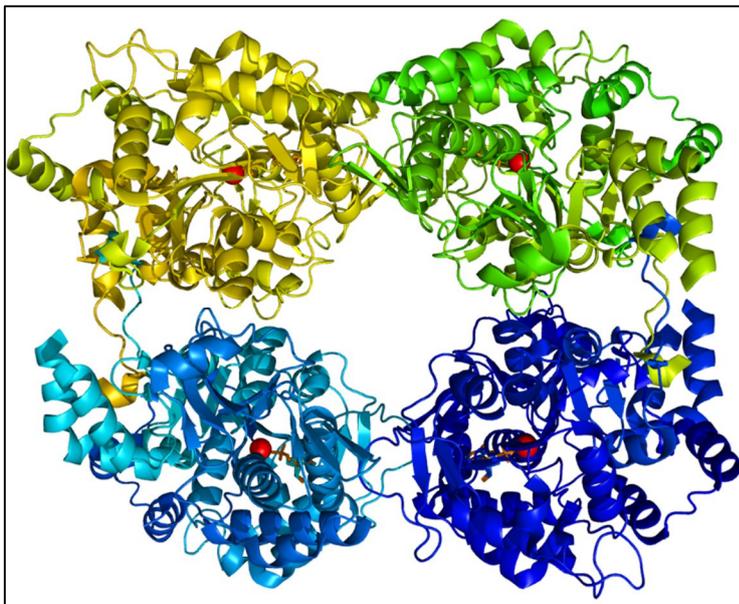


Abb. 2.8 Tetramere Struktur der humanen cN2. Die Abbildung wurde mit dem PDB-Eintrag 2XCV mit Pymol® erstellt. 5'-IMP (orange) und Magnesiumionen (rot) befinden sich im aktiven Zentrum jedes Monomers. Monomere wurden hier in der Cartoon-Ansicht in gelb, grün, dunkelblau und hellblau eingefärbt.

In Säugern wird die cN2 durch diverse Effektoren reguliert. Dabei wirken 2,3-Bisphosphoglycerat, ADP, Ap₄A und ATP aktivierend (Itoh 1993; Bontemps et al. 1988; Pinto et al. 1986), während Phosphat inhibierend wirkt (Sychała et al. 1988). Die Inhibierung durch Phosphat kann durch physiologische Konzentrationen an ATP jedoch aufgehoben werden (Pesi et al. 1996; Pesi et al. 1994). Durch Kristallstrukturanalysen wurde gezeigt, dass die Bindung der aktivierenden Effektoren unabhängig vom aktiven

Zentrum erfolgt (Pesi et al. 2010; Walldén et al. 2007). Damit ist die cN2 ein allosterisch reguliertes Enzym.

Die cN2 weist neben der 5'-Nukleotidaseaktivität auch die oben beschriebene Phosphotransferaseaktivität auf (Worku und Newby 1982). Bekannterweise werden solche Übertragungen auch von Nukleosidkinasen katalysiert, die hierfür jedoch ATP verbrauchen. Die Phosphotransferaseaktivität der cN2 wird durch die Natur des Katalysemechanismus begründet und ist ATP-unabhängig. Ausschlaggebend sind hierfür die beiden Aminosäuren an Position 4 und 5 im Motiv I ([DxD(Y/M)(T/V/C)]; Pesi et al. 2010). Die cN2 bevorzugt die Übertragung des Phosphates auf das Nukleosid Inosin, besonders in Gegenwart des Aktivators 2,3-Bisphosphoglycerat. Die Phosphotransferaseaktivität der cN2 wäre physiologisch sinnvoll, da beispielsweise für die Xanthosin- und Inosin-Verwertung keine spezifischen Kinasen bekannt sind. Die Übertragung des Phosphates durch die 5'-Nukleotidase 2 wäre eine Möglichkeit, diese Nukleoside für die Zelle zu erhalten (Barsotti et al. 2005). Eine andere Hypothese sieht in der Phosphotransferaseaktivität der cN2 die Möglichkeit, Desoxynukleotide unabhängig von der Ribonukleotidreduktase zu erzeugen. So würde durch die Übertragung des Phosphates auf Desoxyinosin 5'-dIMP entstehen, das über das Purinnetzwerk wieder zu 5'-dAMP und 5'-dGMP umgewandelt werden könnte (Tozzi et al. 1991). Ob die Phosphotransferaseaktivität der cN2 tatsächlich eine physiologische Relevanz besitzt, wird vor allem unter pharmakologischen Gesichtspunkten noch diskutiert (Galmarini et al. 2003a; Turriani et al. 1994). Zahlreiche Untersuchungen deuteten darauf hin, dass das Phosphat auf pharmazeutisch relevante Nukleosidanaloga übertragen werden kann und diese damit aktiviert, wie beispielsweise Acyclovir und 8-Azaguanosin (Itoh 2013; Banditelli et al. 1996; Keller et al. 1985). Dem entgegen sprechen neuere Studien, die zeigen konnten, dass insbesondere die 5'-Nukleotidaseaktivität der cN2 zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Nukleotidanaloga führte (Cividini et al. 2015). Einige Studien legten nahe, dass die Phosphotransferaseaktivität der cN2 bei physiologischem pH und physiologischen Phosphatkonzentrationen sowie in Anwesenheit des Aktivators 2,3-Bisphosphoglycerat bevorzugt gegenüber der 5'-Nukleotidaseaktivität abläuft (Tozzi et

al. 1991). Ohne die oben genannten Aktivatoren ist die cN2 jedoch hauptsächlich als 5'-Nukleotidase aktiv.

Die physiologische Relevanz der cN2 ist immer noch umstritten, da für die meisten Hypothesen der experimentelle Beleg fehlt (Itoh 2013; Tozzi et al. 2013; Bretonnet et al. 2005). Die hohe Konservierung und die ubiquitäre Expression des cN2-Transkriptes sprechen für eine wichtige Funktion dieses Enzyms. Durch die Aktivierung durch ATP und ADP und die Inhibierung durch die Phosphatkonzentration kann die cN2 besonders in Sauerstoffmangelsituationen (d.h. die ATP-Konzentration ist niedrig) effektiv inhibiert werden (Pesi et al. 1994). Diese Regulation trägt mutmaßlich zum Erhalt der wichtigen Purinbausteine in der Zelle bei und erhält somit die Homöostase des Purinnukleotidhaushaltes. Die cN2 ist außerdem Bestandteil des 5'-IMP-Substratzyklus und könnte damit die Verfügbarkeit intrazellulären 5'-IMPs unter Verbrauch von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) beeinflussen (s. 2.2.2, Gazziola et al. 2001). Durch den 5'-IMP-Substratzyklus, auch Oxypurin-Zyklus genannt, wird zudem die zelluläre PRPP-Konzentration kontrolliert (Itoh 2013). Die Kontrolle ist wichtig, um eine exzessive und unausbalancierte *De-Novo*-Synthese von Nukleotiden zu verhindern. Im Organismus ist 5'-IMP nicht nur ein wichtiges Intermediat während der Umwandlung von Purinen ineinander, sondern auch ein Vorläufermolekül für die Synthese aller Purinnukleotide (s. Abb. 2.2). Die Aktivität einiger wichtiger Stoffwechsellzyme wird zudem von 5'-IMP beeinflusst, wie z. Bsp. die der Glucose-1,6-bisphosphatase (Guha und Rose 1983). Wird 5'-IMP durch cN2 dephosphoryliert, entsteht Inosin, welches dann weiter durch die Purinnukleosidphosphorylase zu Hypoxanthin umgesetzt und letztendlich als Harnsäure ausgeschieden werden kann (s. Abb. 2.4).

Die Überexpression der cN2 in verschiedenen Zelllinien führte zu einer Reduktion der zellulären Nukleotidkonzentration um 30% (Sala-Newby et al. 2000; Rampazzo et al. 1999). Es wurde hierbei auch eine erhöhte Sekretion von Inosin, Hypoxanthin und Guanosin beobachtet. Bemerkenswerterweise führte eine starke Überexpression der cN2 in HEK293T-Zellen zu vermehrtem Zelltod (Gazziola et al. 1999). Durch cN2-mRNA *silencing*-Experimente in humanen und murinen Skelettmuskelzellen wurde deren Nukleotidase 2-Aktivität auf 40% reduziert (Kulkarni et al. 2011). Diese Reduktion

verursachte einen Anstieg des intrazellulären 5'-AMP-Spiegels und hatte starken Einfluss auf den Glukose- und Lipidhaushalt dieser Zellen. Eine Reduktion der cN2-mRNA in Astrozytomazellen durch Behandlung mit siRNAs korrelierte mit einer verstärkten Apoptoserate (Careddu et al. 2008). In diesem Kontext wurde postuliert, dass die cN2 eine essentielle Funktion im Metabolismus hat, ohne dass der entscheidende Mechanismus benannt werden konnte.

Klinisch wurde eine erhöhte Nukleotidase 2-Aktivität direkt mit der Schwere von neurologischen Symptomen beim Lesch-Nyhan-Syndrom in Verbindung gebracht (Garcia-Gil et al. 2003). Außerdem bestimmt die Höhe der Aktivität der cN2 maßgeblich die Überlebenschancen bei einer akuten myeloischen Leukämie (Galmarini et al. 2003b). Vermutlich ist hierfür die 5'-Nukleotidaseaktivität der cN2 verantwortlich, die für eine Resistenz gegenüber verschiedenen Purinderivaten sorgt, die beispielsweise zur Behandlung der Leukämie, von viralen Erkrankungen und von Tumoren eingesetzt werden (Hunsucker et al. 2005; Mazzon et al. 2003). Gestützt wird diese Hypothese durch eine beobachtete gesteigerte cN2-Expression in Zelllinien, die mit diesen Purinanalogen inkubiert wurden (Dumontet et al. 1999).

2.4.2 Die zytosolische Nukleotidase 3A

Die zytosolische Nukleotidase 3A (cN3A, NT5C3A), auch pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase (P5'N-1), p36 oder 5'-UMP-Hydrolase Typ 1 (UMPH-1) genannt, erkennt spezifisch Pyrimidinribonukleosidmonophosphate, wie 5'-CMP und 5'-UMP. Die cN3A ist auch in der Lage, Pyrimidindesoxynukleotide umzusetzen und überschneidet sich damit im Substratspektrum mit der desoxynukleotidspezifischen 5'-Nukleotidase (cdN, dNT5C). Die cN3A wurde bereits 1974 entdeckt und zunächst aus humanen Erythrozyten gereinigt und charakterisiert (Torrance et al. 1977; Valentine et al. 1974). Diese Zellen verlieren während ihrer Reifung sowohl den Nukleus als auch ihre Mitochondrien. Die cN3A baut mutmaßlich die Pyrimidinnukleotide ab, die durch den Abbau der ribosomalen RNA während der Erythrozytenreifung als 5'-NMPs freigesetzt werden (Valentine et al. 1974). Die zytosolische Nukleotidase 3A wurde mittlerweile durch Homologievergleiche in 129 verschiedenen Spezies nachgewiesen, u.a. in

Fröschen, Vögeln, Fischen, Reptilien und Säugern (Sequenzvergleich mit OrthoDB v8; Kriventseva et al. 2015). Überraschenderweise wurden in 55% dieser Spezies sogar zwei Gene für die cN3 gefunden (cN3A und cN3B).

In der Literatur wird die cN3A oft als inaktiv gegenüber Purinnukleotiden beschrieben (Amici und Magni 2002; Amici et al. 1997; Paglia und Valentine 1975). Es wurde daher postuliert, dass die Spezifität für Pyrimidine für den Erhalt der Purinnukleotide im Erythrozyten sorgt, da der Vorrat an ATP hier limitiert ist und eine Neusynthese nicht stattfinden kann (Paglia et al. 1984). Die Umwandlung zum Adenosin durch eine 5'-Nukleotidaseaktivität würde einen Membrantransport des Nukleosides ermöglichen und ist daher zu verhindern.

Das Gen der cN3A beinhaltet 11 Exons, aus denen vier verschiedene Spleißvarianten hervorgehen können. Die Transkripte der Isoform 1 (297 Aminosäuren (aa)) und 3 (286 aa) wurden in Retikulozyten und Lymphozyten nachgewiesen (Marinaki et al. 2001). Durch *exon array*-Analysen von RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien wurde nachgewiesen, dass die mRNA der Variante 1 tatsächlich am häufigsten exprimiert vorliegt. Aus humanen Erythrozyten wurde jedoch nur eine cN3A-Variante mit 286 Aminosäuren isoliert, also die Isoform 3. Die Isoform 3 weist auch den niedrigsten K_M -Wert für das Substrat 5'-CMP auf ($145 \pm 5,6 \mu\text{M}$), währenddessen die Isoform 1 einen um Faktor 3 höheren K_M -Wert aufweist ($413 \pm 37 \mu\text{M}$). Das längste Protein, Isoform 2 (336 aa) ist ein membrangebundenes Protein im Endoplasmatischen Retikulum und ist geläufig unter dem Namen p36 (Amici et al. 2000). Es wird beispielsweise in Raji-Zellen, einer hematopoetischen humanen Zelllinie, durch α -Interferon induziert und sammelt sich in sogenannten *Lupus inclusions* (Lu et al. 2000; Rich et al. 1996). Erstaunlicherweise zeigt die Isoform 2 keine Aktivität gegenüber 5'-CMP, obwohl sie die katalytisch relevanten Peptidsequenzen enthält. Isoform 4 (285 aa) wurde bis jetzt nur in Retikulozyten nachgewiesen (Kanno et al. 2004).

In der Kristallstruktur der murinen cN3A zeigte sich die für diese Enzymklasse typische HAD-Faltung (s. Abb. 2.6; PDB-ID: 4KX5; Bitto et al. 2006). Jedoch besteht die *cap*-Domäne der cN3A aus zwei Subdomänen, einer C1- und einer C2-Domäne. Das Enzym

ist im Gegensatz zur cN2 als Monomer aktiv (Amici et al. 2005). Durch das Lösen mehrerer Kristallstrukturen der ^{Mm}cN3A wurde auch der allgemeine Katalysemechanismus der zytosolischen 5'-Nukleotidasen aufgeklärt (s. Abb. 2.7). Eine Mutation des katalytisch aktiven ersten Aspartates im Motiv I zu Asparagin unterbindet jegliche katalytische Aktivität der ^{Mm}cN3A (Grobosky et al. 2012). Obwohl Asparagin strukturell dem Aspartat sehr ähnlich ist, kann dieses nicht die Säure/Base-vermittelte Katalyse bewerkstelligen. Die enzymatische Aktivität wurde auch vollständig durch Zugabe von Pb²⁺-Ionen gehemmt (Bitto et al. 2006). Andere Me²⁺-Ionen wirkten sich ebenfalls inhibierend aus, wie Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ und Ni²⁺. Anstatt des für die Katalyse essentiellen Magnesium-Ions binden die Me²⁺-Ionen im aktiven Zentrum und verhindern somit den Umsatz der 5'-NMPs (Amici et al. 1994). Die Enzymaktivität wurde zudem durch Behandlung mit EDTA vollständig inhibiert, da auch hier das Mg²⁺-Ion aus dem aktiven Zentrum entfernt wird. In der Kristallstruktur der ^{Mm}cN3A wurden zwei Cysteinreste ausgemacht, die an der Oberfläche des Enzyms exponiert vorlagen (Cys34 und Cys64; Grobosky et al. 2012). Diese beiden Reste könnten für die beobachtete Empfindlichkeit des Proteins gegenüber oxidierenden Bedingungen verantwortlich sein. In der Kristallstruktur wurden keine Phosphorylierungsstellen nachgewiesen.

Es wurde postuliert, dass die stringente Unterscheidung zwischen Purinen und Pyrimidinen durch einen Asparaginrest (Asn69) bzw. einen Tyrosinrest (Tyr114) vermittelt wird (Bitto et al. 2006). In *molecular docking*-Studien wurde gezeigt, dass beide Reste bei der Bindung eines Purinnukleotides im aktiven Zentrum sterisch mit dessen Purinring kollidieren würden. Es wurde auch demonstriert, dass die gesamte Höhlung der Substratbindetasche zu klein für die größeren Purinringe ist. Die Unterscheidung zwischen Desoxynukleotiden und Ribonukleotiden erfolgt in der ^{Mm}cN3A durch einen Glutamatrest (Glu96), der zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Ribose ausbildet und nur eine Wasserstoffbrücke zu der Desoxyvariante.

Auffälligerweise wird die zytosolische Nukleotidase 3A nicht durch Effektoren wie beispielsweise ATP und ADP reguliert (Amici et al. 1994). Es wurde jedoch eine Produkthemmung nachgewiesen, die sowohl durch das Phosphat, als auch das

Nukleosid vermittelt wird (Amici et al. 1994). Die Hemmung mittels Phosphat ist kompetitiv mit einem K_i von 3,5 mM. Die Hemmung durch das Nukleosid ist nichtkompetitiv (z.B. mit Uridin ein K_i von 20 mM).

Die cN3A weist, wie die cN2, ebenfalls eine Phosphotransferaseaktivität auf. Die Aktivität ist von pharmazeutischem Interesse, da sie die Möglichkeit bietet, hierüber Nukleosidanaloga zu phosphorylieren. Dadurch können diese Nukleosidanaloga unabhängig von anderen zellulären Kinasen aktiviert werden, da diese die Analoga nicht als Substrat erkennen (Pesi et al. 1994; Keller et al. 1985). Jedoch degradiert die Nukleotidaseaktivität der cN3A auch Wirkstoffe wie Gemcitabine und AraC, Nukleotidanaloga, die zur Behandlung von Krebs verabreicht werden. Bemühungen, die eine oder andere Aktivität nutzbar zu machen bzw. auszuschalten, sind bis jetzt nicht zum Abschluss gekommen. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die Einzelmutation des Glutamates 96 zum Glutamin ausreichend ist, um eine Phosphotransferaseaktivität komplett zu unterbinden (Magni et al. 2013).

Angeborener cN3A-Mangel ist im Menschen die häufigste Störung im Nukleotidstoffwechsel (Chiarelli et al. 2006a; Zanella et al. 2006). Der Aktivitätsverlust führt in Patienten zu nicht-spherozytischer hämolytischer Anämie (Vives-Corrons et al. 1976; Ben-Bassat et al. 1975; Valentine et al. 1974). Es handelt sich hierbei um eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit (Valentine et al. 1974). Durch einen Blutausstrich und anschließende Wright-Färbung zeigen Erythrozyten dieser Patienten eine sogenannte basophile Tüpfelung, die mikroskopisch nachweisbar ist. Vermutlich wird die Tüpfelung durch die Akkumulation von Nukleotiden verursacht, die 3- bis 6-fach angereichert in diesen Erythrozyten vorliegen, davon ca. 80% Pyrimidine (Simmonds et al. 1988; Valentine et al. 1974). Dadurch wird weiterer ribosomaler RNA-Abbau während der Reifung dieser Zellen verhindert. Neben den Pyrimidinnukleotiden werden auch nukleotidhaltige Verbindungen akkumuliert, wie beispielsweise CDP-Cholin und CDP-Ethanolamin, die beide Vorläufer für Bestandteile der Zellmembran sind (Swanson et al. 1984). Eine Hypothese zur Erklärung der Hämolyse schreibt der Akkumulation dieser nukleotidhaltigen Verbindungen eine Strukturstörung der Erythrozytenmembran zu, die letztendlich zum Platzen der Zellen führt (Rees et al.

1996). Dagegen spricht jedoch der Befund, dass Erythrozyten unter cN3A-Mangel durchaus eine normale osmolytische Stabilität besitzen und keine Änderungen in der Phospholipidkonzentration nachweisbar waren (Corrons 2000). Andere Hypothesen machen die Akkumulation der Pyrimidine und die dadurch verursachte pH-Änderung und chelatorische Effekte für die Hämolyse verantwortlich (Swanson et al. 1983). Das Phänomen der Akkumulation von Pyrimidinnukleotiden und der darauffolgenden Hämolyse wurde auch bei Bleivergiftungen beobachtet (Paglia et al. 1977). In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte cN3A-Aktivität (auf 30%) gefunden. Dieser Phänotyp wird erklärbar, bedenkt man die inhibierende Wirkung der Pb^{2+} -Ionen auf die cN3A. Durch groß angelegte Studien wurden bereits einige natürlich vorkommende Mutationen in der humanen cN3A entdeckt, die in Patienten zu verminderter Aktivität führten (N190S und G241R; Chiarelli et al. 2006b).

2.5 Identifizierung einer m^7GMP -spezifischen 5'-Nukleotidase

Im Vergleich mit rRNA- und tRNA-Molekülen weisen mRNA-Moleküle relativ geringe Halbwertszeiten auf und werden daher kontinuierlich in der Zelle umgesetzt (Phizicky und Hopper 2010; Karnahl und Wasternack 1992). Charakteristisch für mRNAs ist deren 5'- m^7G -*cap*-Struktur, die während des mRNA-Abbaus durch verschiedene, spezifische Enzyme entfernt werden muss (s. Abb. 2.9; Collier und Parker 2004).

In Eukaryoten wurden dafür verschiedene Aktivitäten identifiziert, die abhängig vom mRNA-Abbauweg sind. Erfolgt der Abbau in 5'- zu 3'-Richtung wird die 5'-*cap*-Struktur durch die *decapping*-Proteine Dcp2/Dcp1 zu m^7GDP abgebaut und eine am 5'-Ende einfach phosphorylierte RNA freigesetzt, die dann weiter durch Exoribonukleasen abgebaut wird (van Dijk et al. 2002). Der mRNA-Abbau kann jedoch auch durch das Exosom vom 3'-Ende her erfolgen (Anderson und Parker 1998). So entsteht ein kurzes 5'-*cap*-Oligonukleotid, das ein Substrat für das *scavenger decapping*-Protein (DcpS) ist (Wang und Kiledjian 2001). Es spaltet die ungewöhnliche 5'-5'-Triphosphatverknüpfung zwischen dem m^7G und dem ersten Nukleotid der mRNA zu m^7GMP und einem am 5'-Ende zweifach phosphorylierten Oligonukleotid (Liu et al.

2002; Wang und Kiledjian 2001). Es wurde außerdem gezeigt, dass DcpS auch in der Lage ist m^7GDP zu m^7GMP abzubauen (van Dijk et al. 2003). Diese Beobachtung ist jedoch umstritten, so wurde durch Wypijewska und Kollegen zwar eine affine Bindung des m^7GDP s durch DcpS festgestellt, jedoch eine Abspaltung des Phosphates nicht bestätigt (Wypijewska et al. 2012).

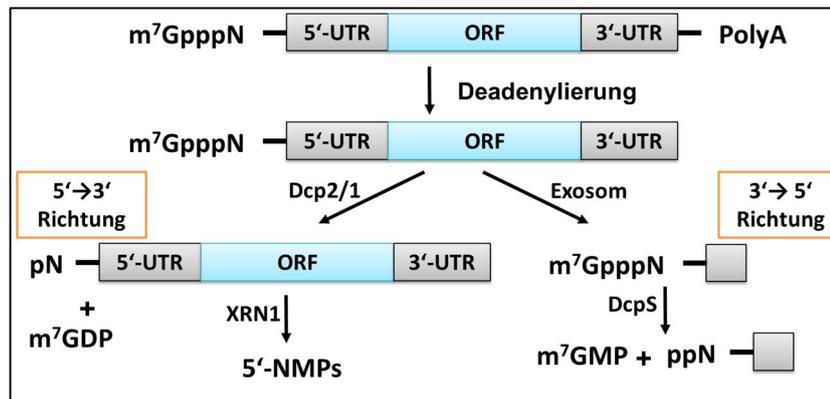


Abb. 2.9 Schematische Darstellung des mRNA-Abbaus in Eukaryoten. Initiiert wird der mRNA-Abbau durch die Deadenylierung (Couttet et al. 1997). Erfolgt der Abbau in 5'- zu 3'-Richtung wird zunächst das 5'-cap durch Dcp2/1 abgebaut und m^7GDP freigesetzt. Der restliche mRNA-Körper wird von XRN1, einer Exonuklease, zu 5'-NMPs abgebaut (Larimer und Stevens 1990). Erfolgt der Abbau in 3'- zu 5'-Richtung wird die mRNA vom Exosom bis auf wenige Nucleotide abgebaut (Anderson und Parker 1998). Die 5'-cap-Struktur dieses kurzen Oligonucleotides wird dann von DcpS in m^7GMP und ein 5'-ppN-Oligonucleotid gespalten (Wang und Kiledjian 2001). Das Oligonucleotid wird anschließend durch Exonucleasen zu 5'-NMPs abgebaut. Abbildung modifiziert nach Wypijewska et al. 2012.

Eine weitere Dephosphorylierung des m^7GMP s wurde erstmalig im Rahmen von *in vitro*-mRNA-Abbaueperimenten mit K562-Zellextrakt (Extrakt aus einer humanen Leukämiezelllinie von myeloischen Blutzellen) beschrieben, jedoch nicht weiter charakterisiert (Wang und Kiledjian 2001). Mit Hilfe eines translationsaktiven *Drosophila melanogaster*-Embryoextraktes (DEE) wurden ebenfalls *in vitro*-mRNA-Abbaustudien durchgeführt (Jeske und Wahle 2008). In den Lebenswissenschaften ist die Taufliege *D. melanogaster* ein beliebter Modellorganismus und eine gute Alternative zu immortalisierten Zelllinien. Ein Vorteil dieses Modellorganismus ist die verringerte Komplexität. Beispielsweise sind am Nucleotidstoffwechsel von *D. melanogaster* im Vergleich zum Menschen nur etwa halb so viele Enzyme und Proteine beteiligt (KEGGs Datenbank; 112). Im DEE wurde ebenfalls die Freisetzung von m^7GMP aus der 5'-cap-Struktur beobachtet, was wahrscheinlich auf eine konservierte DcpS-Aktivität (CG2091) zurückzuführen ist (Buschmann 2010). Außerdem wurde das

freigesetzte m^7GMP auch weiter zu Orthophosphat und 7-Methylguanosin abgebaut, wie es bereits für den K562-Zellextrakt beschrieben wurde (Buschmann 2010; Wang und Kiledjian 2001). Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde diese Dephosphorylierungsaktivität im DEE untersucht (Buschmann 2010). Die Aktivität wurde durch eine klassische chromatographische Reinigung aus Schneider 2 (S2)-Zellextrakt (embryonale *D. melanogaster*-Zelllinie; Schneider 1972) angereichert. Es wurde gezeigt, dass diese neuartige Dephosphorylierungsaktivität spezifisch für den Umsatz von m^7GMP ist, denn das strukturell nahverwandte 5'-GMP wurde im Vergleich viel schlechter umgesetzt. Eine massenspektrometrische (MS)-Analyse der angereicherten Aktivität führte zur Identifizierung einer zytosolischen 5'-Nukleotidase. Die MS-Analyse lieferte dabei nur Peptide, die zu 43% das *D. melanogaster*-Protein CG3362 (^{Dm}cN3B, FBgn0034988) abdeckten, ein bis dahin nicht charakterisiertes Genprodukt. Es wurden keine Peptide eines anderen Proteins detektiert. Durch Sequenzvergleiche mit den bereits bekannten 5'-Nukleotidasen aus Säugern wurden in *D. melanogaster* auch nur zwei zytosolische 5'-Nukleotidasen ausgemacht: zum einen die identifizierte CG3362, die hohe Homologie zu den pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidasen 3A und B aufweist, und ein Homologes zur purinspezifischen 5'-Nukleotidase 2 (CG32549).

2.6 Zielstellung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten zwei zytosolische 5'-Nukleotidasen aus *Drosophila melanogaster* biochemisch und enzymkinetisch charakterisiert werden. Dabei stand besonders die identifizierte 5'-Nukleotidase CG3362 im Vordergrund. Im Menschen finden sich hier zu gleich zwei Homologe: die zytosolischen 5'-Nukleotidasen cN3A und cN3B. Da die Nukleotidase 3 als pyrimidinspezifisch gilt, war es erstaunlich, dass das *D. melanogaster*-Homologe ein modifiziertes Purinnukleotid umsetzen kann. Um diese Diskrepanz zu untersuchen, sollten auch die beiden humanen Enzyme auf Umsatz von m^7GMP getestet werden. Zur humanen cN3B ist bis jetzt nur sehr wenig bekannt, daher sollte dieses Protein ebenfalls charakterisiert werden. Die 5'-Nukleotidasen sollten hierfür rekombinant in *E.coli* erzeugt werden und

bis zur Homogenität gereinigt werden. Wenn möglich sollte durch Proteinstrukturanalysen geklärt werden, wie die Spezifität für m^7GMP vermittelt wird (in Kooperation mit Dr. Thomas Mönecke, Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Ficner). Da die zytosolischen 5'-Nukleotidasen aus *D. melanogaster* noch nicht Gegenstand der Forschung waren, sollte auch deren physiologische Funktion untersucht werden. Hierfür sollten *D. melanogaster*-Nullmutanten erzeugt werden und diese biochemisch und genetisch charakterisiert werden (in Kooperation mit Dr. Thomas Rudolph und Matthias Walther, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Reuter). Dabei sollte insbesondere geklärt werden, in wie weit die 5'-Nukleotidasen wirklich eine regulatorische Funktion beim Erhalt der Nukleotidpool-Homöostase besitzen.

3 Ergebnisse

3.1 Die m^7 GMP-spezifische 5'-Nukleotidase cN3B aus *D. melanogaster*

Im Folgenden wird die enzymologische und enzymkinetische Charakterisierung der 5'-Nukleotidase CG3362 vorgestellt. Außerdem wird auch auf die Expression des Transkriptes und des Proteins in *D. melanogaster* eingegangen.

3.1.1 Das Gen CG3362 und seine Expression in *D. melanogaster*

Das Gen der 5'-Nukleotidase (CG3362) aus *Drosophila melanogaster* befindet sich auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms (zytogenetische Position: 60C2) und ist circa 1500 Basenpaare lang (FlyBase Datenbank; www.flybase.org). Es besitzt nur ein annotiertes Transkript (ca. 900 Nukleotide lang), das zu einem Polypeptid translatiert wird.

Durch die Auswertung der Daten des modENCODE-*Drosophila*-Transkriptom-Projektes und der *FlyAtlas*-Datenbanken wurden drei Beobachtungen gemacht (Flybase-ID: FBlc0000085; Graveley et al. 2011 und FBlc0000157; Chintapalli et al. 2007): Erstens wurde das CG3362-Transkript in allen *D. melanogaster*-Entwicklungsstadien mit einer niedrigen bis moderat hohen Expression detektiert, mit dem höchsten Expressionslevel in 2-4 Stunden (h) alten *D. melanogaster*-Embryonen (s. Abb. 3.1.A und B). Zweitens war das CG3362-Transkript in allen gängigen *D. melanogaster*-Zelllinien nachweisbar, so auch in der zur Reinigung der 5'-Nukleotidaseaktivität verwendeten S2-Zelllinie (nicht gezeigt). Drittens wurde die höchste Transkriptexpression anatomisch betrachtet im Verdauungssystem von Larven und adulten Fliegen gefunden, besonders im Mitteldarmbereich (s. Abb. 3.1.C und D). In adulten Tieren ist das Transkript außerdem in den meisten untersuchten Geweben nachweisbar. Es wurde kein Transkript in den Tracheen und im zentralen Nervensystem detektiert.

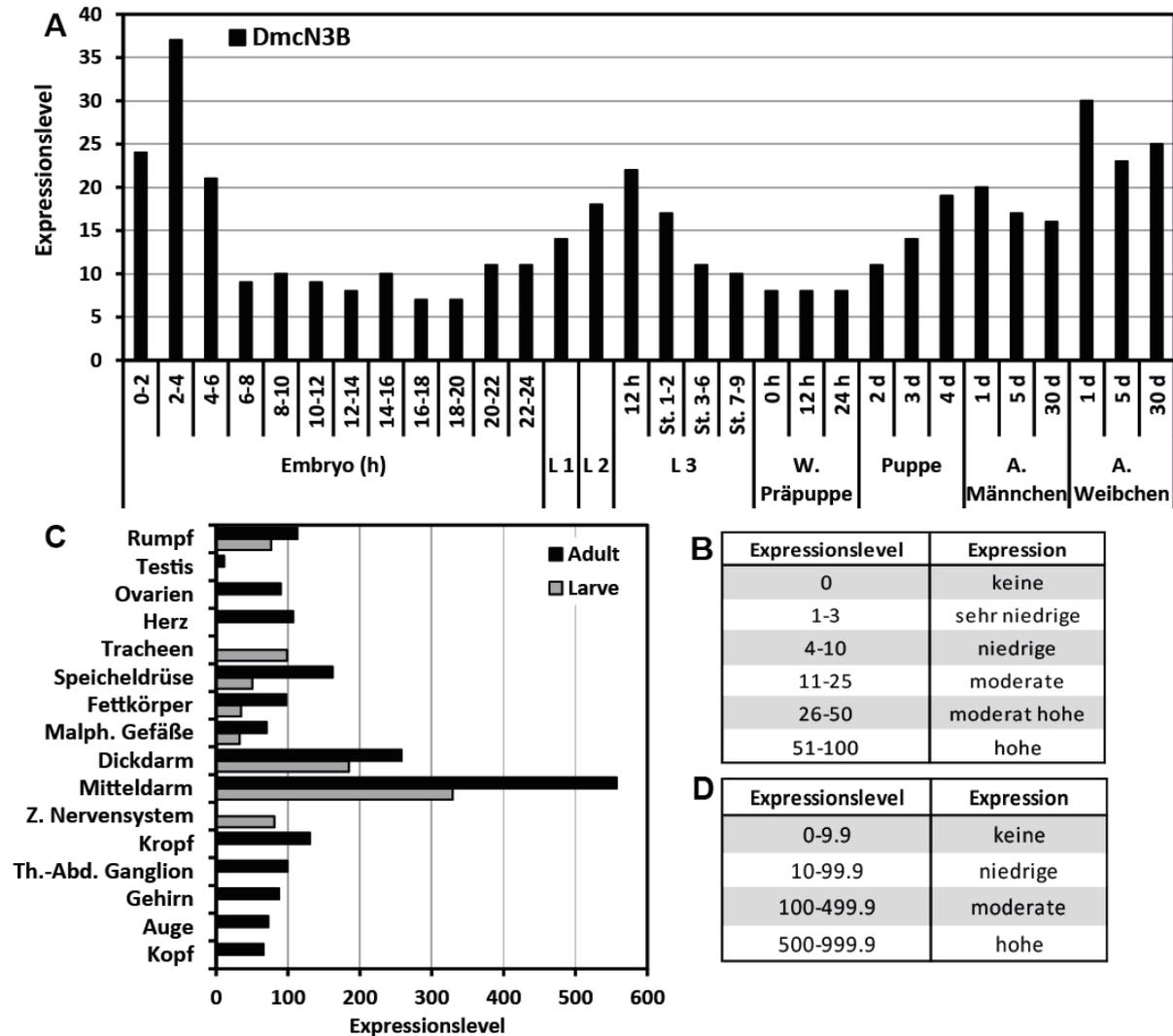


Abb. 3.1 Transkriptexpressionsprofil von CG3362. Die Daten wurden dem modEncode-Transkriptom-Projekt entnommen. Hierfür wurden kurze cDNA-Sequenzen, die aus isolierter *D. melanogaster*-mRNA generiert wurden, mittels *high throughput*-Sequenzierung analysiert. Details zur Generierung und Auswertung der RNA-Seq-Microarray-Daten wurden in Graveley et al. 2011 veröffentlicht (Flybase ID FBIC0000085). Der Transkriptexpressionswert errechnet sich aus den erhaltenen RNA-Seq-coverage Daten, die durch die Anzahl der gesamten bei FlyBase annotierten Exons (Annotation Release 5.26) geteilt wurden. Die hier dargestellten Einzelwerte geben also die durchschnittliche Transkriptabdeckung pro Kilobase pro Gen an. Die Daten für jedes Gen wurden dann ihrem Wert entsprechend in definierte Expressionslevel (B und D) eingeteilt. **A und B**) Transkriptexpression von CG3362 während der *D. melanogaster*-Entwicklung. Das Transkript ist in allen untersuchten Stadien nachweisbar mit einer niedrigen bis moderat hohen Expression. Die höchste Expression wurde während der Embryogenese in 2-4 h alten Embryonen detektiert. **C und D**) Gewebespezifische Transkriptexpression in Larven und adulten Tieren. Das Transkript CG3362 wurde insbesondere in den Verdauungsorganen (Mittel- und Dickdarm) mit hohem Expressionslevel detektiert. L, Larve; W., weiß; A., Adult; Z., Zentrales; Th.-Abd., Thoraxiales-abdominales.

3.1.2 ^{Dm}cN3B-Konservierung

Das CG3362-Protein ist mit einer Identität von 39% und einer Ähnlichkeit von 59% zwischen *D. melanogaster* und den humanen Homologen gut konserviert (s. Tab. 3.1; ClustalX® Sequenzvergleich; Larkin et al. 2007).

Tab. 3.1 Eine Auswahl durch Sequenzvergleiche gefundener Homologe zum CG3362-Protein (*basic local alignment search tool (blast), pubmed-Datenbank*). Hier aufgelistet sind die Identität, sowie die Ähnlichkeit (jeweils in %) des CG3362-Proteins (NP 611895.1) zu Homologen aus Mensch (NP 443167.3) und anderen Säugern (*M. musculus* NP 001096120.1), sowie zu Vertretern von Vögeln (*G. gallus* NP 001006334.1), Fischen (*D. rerio* NP 955854.1), Fröschen (*X. laevis tropicalis* NP 001123701.1), Nematoden (*C. elegans* Y10G11A.1) und Pflanzen (*O. sativa* NP 001050781.2).

Organismus	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
<i>D. melanogaster</i>	100	100
<i>G. gallus</i>	41	60
<i>M. musculus</i>	40	61
<i>H. sapiens</i>	39	59
<i>X. laevis tropicalis</i>	38	60
<i>D. rerio</i>	37	62
<i>C. elegans</i>	33	53
<i>O. sativa</i>	33	52

Das Protein wurde in Säugern sowie in Vögeln, Fröschen, Fischen, Insekten und Pflanzen durch Sequenzvergleiche nachgewiesen (s. A.1.I.2). In den meisten evolutionär jüngeren Organismen finden sich sogar je zwei Homologe zum *D. melanogaster*-Protein, vormals als cNIII und cNIII-like bezeichnet, jetzt cN3A und cN3B. Aufgrund der höheren Ähnlichkeit zur cN3B-Variante wurde das Genprodukt aus *D. melanogaster* in ^{Dm}cN3B umbenannt (Kommunikation mit Uniprot; www.uniprot.org). Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurde in *D. melanogaster* neben der ^{Dm}cN3B noch eine weitere nicht charakterisierte, zytosolische 5'-Nukleotidase gefunden (CG32549), eine putative purinspezifische 5'-Nukleotidase. Außerdem wurden zwei weitere HAD-ähnliche Familienmitglieder und mehrere Vertreter der ekto-solischen 5'-Nukleotidasefamilie identifiziert, die jedoch in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurden (s. A.1.II.1).

3.1.3 D^m cN3B-Expression in allen Entwicklungsstadien

Das Protein D^m cN3B wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (α - D^m cN3B) in allen Stadien der *D. melanogaster*-Entwicklung nachgewiesen (s. Abb. 3.2.A, s. 5.7.2). Hierfür wurden Embryonen mit fortschreitender Entwicklung (0-22 h), Larven der Stadien 2 und 3, sowie adulte Tiere auf Proteinexpression untersucht. Die D^m cN3B wurde außerdem sowohl in *D. melanogaster*-Embryoextrakt (DEE), als auch in S2-Zelllysate nachgewiesen (s. Abb.3.2.B, s. 5.3.1 und 5.5.6).

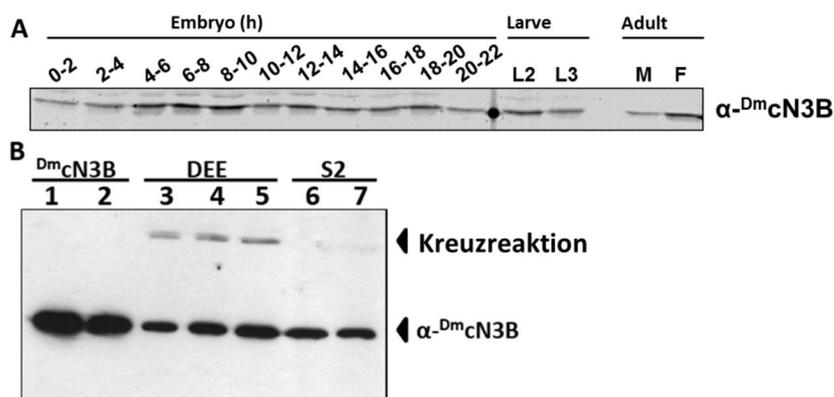


Abb. 3.2 Westernblot-Analyse zur Untersuchung der D^m cN3B-Expression. **A)** Expression während der *D. melanogaster*-Entwicklung. D^m cN3B wurde in allen untersuchten Stadien nachgewiesen. *D. melanogaster*-Embryonen wurden nach Ablage zu den angegebenen Zeiten geerntet und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Larven verschiedener Stadien sowie adulte Tiere, wurden gesammelt und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Nach einer SDS-PAGE und anschließender Westernblot-Analyse wurde D^m cN3B mit dem α - D^m cN3B-Antikörper und einem sekundären R^{n} IRdye680-Antikörper in einem Likor-Gerät nachgewiesen (Odyssey 2.1® Software). **B)** D^m cN3B wurde im DEE und im S2-Zelllysate nachgewiesen. Spuren 1 und 2 entsprechen 20 und 10 ng rekombinatem D^m cN3B. Spuren 3, 4 und 5 entsprechen 10, 20 und 40 μ g DEE. Spuren 6 und 7 entsprechen 200 und 100 μ g S2-Zelllysate. L, Larve; M, Männchen; F, Weibchen.

Im ersten Schritt zur Reinigung der m^7 GMP-dephosphorylierenden Aktivität wurde der S2-Zellextrakt über DEAE (Diethylammoniummethyl)-Material fraktioniert. Im Aktivitätsprofil der gesammelten Fraktionen wurden zwei Aktivitätspeaks ausgemacht (Buschmann et al. 2013). Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers wurde jedoch gezeigt, dass nur der Aktivitätspeak bei niedrigen Salzkonzentrationen (ca. 175 mM) auf D^m cN3B-Aktivität zurückzuführen ist (nicht gezeigt). Die Aktivität des zweiten Peaks bei höheren Salzkonzentrationen wurde während dieser Arbeit nicht näher untersucht, ist aber vermutlich einer unspezifischen Phosphatase zuzuordnen.

3.1.4 Lokalisierung im *D. melanogaster*-Embryo

Die Lokalisierung der $^{Dm}cN3B$ im frühen Embryo wurde durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierfür wurden Wildtypembryonen mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und α - $^{Dm}cN3B$ inkubiert (s. Abb. 3.3.A, s. 5.7.5).

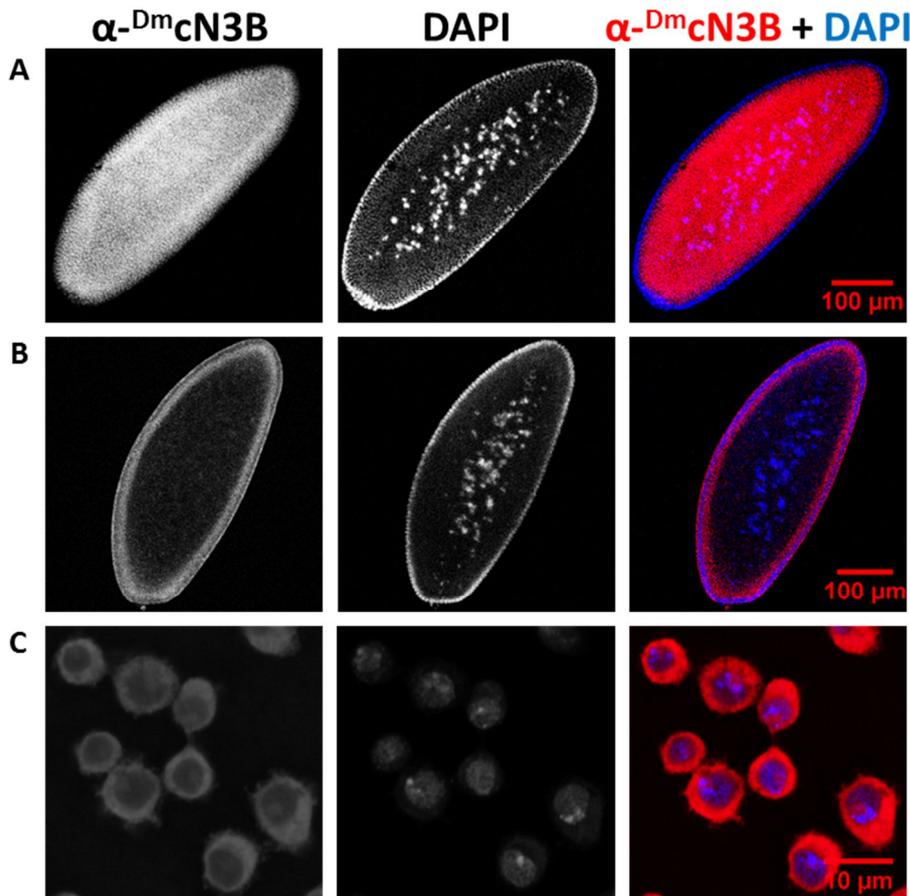


Abb. 3.3 Die $^{Dm}cN3B$ -Lokalisierung im *D. melanogaster*-Embryo und in S2-Zellen. *D. melanogaster*-Embryonen (0-2 h) wurden dechorionisiert, mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit DAPI und α - $^{Dm}cN3B$ inkubiert. $^{Dm}cN3B$ wurde durch Inkubation mit einem sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper (Rn Alexa 488) im Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, LSM780) sichtbar. **A)** Gesamtübersicht eines repräsentativen Wildtypembryos (Zyklus 12-13). **B)** Hintergrundsignal des affinitätsgereinigten α - $^{Dm}cN3B$ s in einem $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Embryo (Zyklus 11-12). Es ist noch ein schwaches Signal in der Peripherie des Embryos zu detektieren. **C)** S2-Wildtypzellen zeigten ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation der $^{Dm}cN3B$. DAPI in Blau, α - $^{Dm}cN3B$ in Rot.

Die Detektion der $^{Dm}cN3B$ erfolgte durch Inkubation mit einem sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper. Wie in Abb. 3.3.A zu erkennen ist, wurde die $^{Dm}cN3B$ tatsächlich im ganzen Embryo im Zytoplasma nachgewiesen, nicht in den Nuklei. Die Färbung im Zytoplasma war gleichmäßig. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorbehalt zu betrachten, da der verwendete $^{Dm}cN3B$ -Antikörper trotz

Affinitätsreinigung ein Hintergrundsignal in einem $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryo (Nullmutante) lieferte (s. Abb. 3.3.B, s. 3.5.1). Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen des Westernblots mit DEE, da auch hier mit demselben Antikörper eine Kreuzreaktion bei ca. 70 kDa detektiert wurde (s. Abb. 3.2.B). Die zytoplasmatische Lokalisierung wurde auch in S2-Wildtypzellen bestätigt (s. Abb. 3.3.C).

3.1.5 Rekombinante Darstellung der $D^m cN3B$

Zur Reinigung und Charakterisierung der m^7GMP -spezifischen 5'-Nukleotidase $D^m cN3B$ wurde deren cDNA über RT-PCR aus S2-Zell-RNA amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert (s. 5.4.1-3). Die rekombinante Expression des SUMO-fusionierten Proteins erfolgte anschließend in *E. coli*-Zellen (s. 5.5.1). Die Analyse der Expression mittels SDS-PAGE wies nach Induktion ein überproduziertes Protein bei einem Molekulargewicht bei ca. 50 kDa auf (s. A.1.1.3). Das erwartete Molekulargewicht des His₆-SUMO- $D^m cN3B$ s beträgt 49,7 kDa (Protean®, DNASTar software). Nach Aufschluss der *E. coli*-Zellen und anschließender Zentrifugation erfolgte die Reinigung der $D^m cN3B$ bis zur Homogenität aus dem geklärten Lysat in mehreren Schritten über Affinitäts- und Hydroxyapatitchromatographie (s. Abb. 3.4; s. 5.5.2, s. A.1.1.3-5).

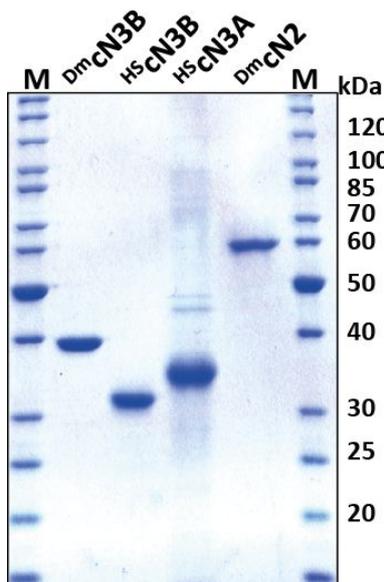


Abb. 3.4 Gel einer SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten zytosolischen 5'-Nukleotidasen. Auf ein 10%iges SDS-Gel wurden jeweils 2 μ g Protein aufgetragen, außer bei $D^m cN2$. Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration wurden hier nur 1,2 μ g aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt.

Für die darauffolgenden Experimente war es essentiell, die Phosphatkonzentration der vereinigten Fraktionen zu minimieren. Daher wurden die vereinigten Hydroxyapatitfraktionen zum Abschluss der Reinigung sehr ausgiebig gegen phosphatfreien Puffer dialysiert. Die Proteinkonzentration der ^{Dm}cN3B wurde spektrometrisch bestimmt und betrug 27,5 µM (s. 5.5.3). Eine MS-Analyse der Molekülgesamtmasse bestätigte die rekombinante Darstellung vollständigen Proteins mit intaktem N-Terminus mit einem ermittelten Molekulargewicht von 36292 g/mol (s. 5.5.4; Daten nicht gezeigt). Das theoretisch berechnete Molekulargewicht beträgt nach Protean® 36,29 kDa.

3.1.6 ^{Dm}cN3B ist ein Monomer

Das native Molekulargewicht der ^{Dm}cN3B wurde durch Sedimentationsexperimente im Gleichgewicht ermittelt (in Kooperation mit Dr. Bodo Moritz und PD Dr. Hauke Lilie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg). Hierfür wurde eine konzentrierte ^{Dm}cN3B-Lösung ultrazentrifugiert und die ^{Dm}cN3B-Konzentration entlang einer radialen Achse innerhalb einer Rotationszelle bestimmt, solange bis die Konzentration des Proteins über die Länge der Achse konstant blieb (s. 5.5.5). Die erhaltene Kurve wurde anschließend mit der Formel 1 ausgewertet und das apparente Molekulargewicht berechnet (s. Abb. 3.5, Origin®, PD Dr. Hauke Lilie):

$$c(x) = c_0 * e^{\frac{\sigma * (r^2 - r_0^2)}{2}} \quad (\text{Formel 1})$$

mit c , als makromolekularer Konzentration, r , als Distanz vom Rotationszentrum und σ , für $M \cdot (1 - v\rho) \cdot \omega^2$ (s. 5.5.5).

Um die Möglichkeit der Oligomerisierung experimentell zu gewährleisten, wurde eine Konzentration von 1 mg/mL ^{Dm}cN3B verwendet. Das experimentelle Molekulargewicht der ^{Dm}cN3B beträgt 37,1 kDa. Daraus ergibt sich, dass die ^{Dm}cN3B in Lösung nativ als Monomer vorliegt.

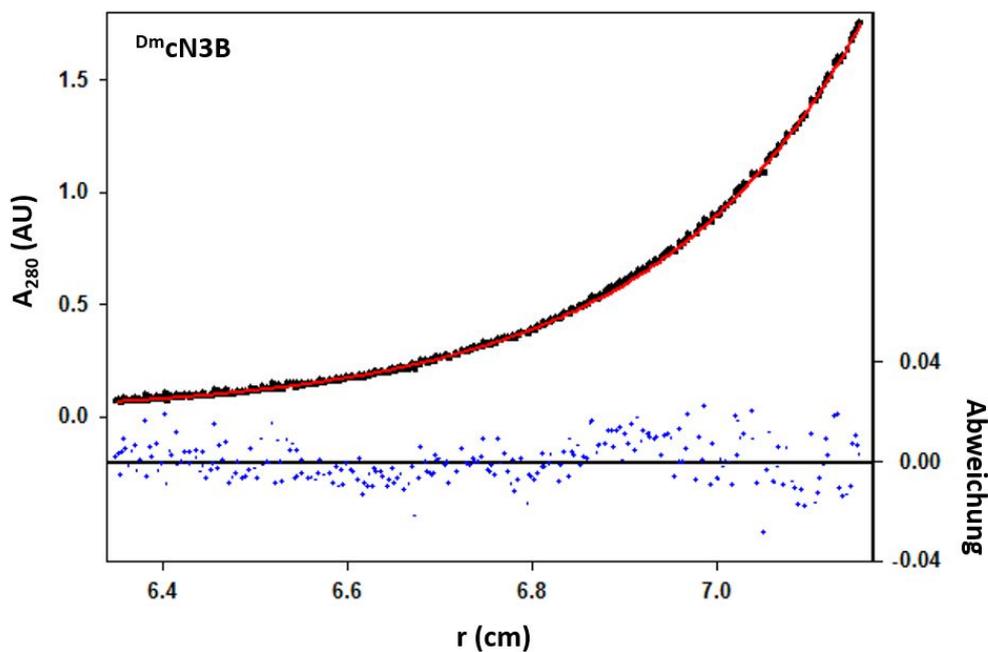


Abb. 3.5 Bestimmung der molaren Masse der D^m cN3B durch ein Sedimentationsexperiment im Gleichgewicht. Die Ausgangskonzentration der D^m cN3B betrug 1 mg/mL. Die mathematische Anpassung an den Graphen wurde nach Formel 1 ausgeführt (rote Linie, Origin®). A, Absorption bei 280 nm; r, Distanz vom Rotationszentrum.

3.1.7 Etablierung eines colorimetrischen Dephosphorylierungstestes

Die 5'-Nukleotidaseaktivität der D^m cN3B wurde mit Hilfe eines colorimetrischen Tests untersucht, der spezifisch freies Orthophosphat detektiert und nicht auf Pyrophosphat reagiert. Hierbei sorgt die Einbindung des Orthophosphates in Polymolybdat-Malachitgrün-Komplexe für eine Reduzierung des Farbstoffes Malachitgrün, so dass ein Farbumschlag von Orange nach Grün erfolgt (s. 5.6.4; Fisher und Higgins 1994; Geladopoulos et al. 1991; Baykov et al. 1988).

Zu Beginn einer Messung mit frischer Färbelösung wurde eine Kalibriergerade mit Phosphat erstellt, die möglichst unter denselben Pufferbedingungen wie die nachfolgende Analyse angefertigt wurde. Die Enzymreaktion wurde direkt durch die Zugabe der Färbelösung gestoppt, da die in der Färbelösung enthaltene Schwefelsäure sofort den pH-Wert der Lösung unter pH 4 senkte und das Enzym inaktivierte (s. unten). Der Einfluss der einzelnen Reaktionsbestandteile, sowie Substrate, Produkte und Enzymlösungen auf die Färbereaktion wurde ebenfalls untersucht (s. Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Einfluss einiger Komponenten der Enzymreaktion mit ihren verwendeten Konzentrationen. Keinen Effekt zeigten folgende Bestandteile des Reaktionsmix: Tris-HCl pH 7,5 und HEPES pH 7,5 (jeweils 20 mM), KCl (bis 300 mM), MgAc₂ (5 mM), EDTA (20 mM), Saccharose (10% (w/v)).

Substanz	Konzentration	Effekt
DTT	3 mM	Reduzierte Sensitivität
Glycerin	10% (w/v)	Verlängerte Färbereaktion, reduzierte Sensitivität
5'-NMP	Ab 3 mM	Erhöhter Nullwert, verlängerte Färbereaktion, insbesondere für 5'-CMP
Nukleoside	Ab 3 mM	Verlängerte Färbereaktion
Orthophosphat	ab 25 µM	Aggregatbildung (Polymolybdat-Phosphat-Komplexe)
^{Dm} cN3B	µM	Erhöhter Nullwert

Dabei zeigte sich, dass besonders die unkatalysierte Hydrolyse der 5'-NMPs eine Ursache für Phosphatkontaminationen war. Hohe Phosphatkonzentrationen (über 25 µM) wurden vom Phosphattest nicht toleriert und führten zur Ausbildung eines dunkelblauen Niederschlags (hochpolymerisierte Molybdat-Phosphat-Komplexe). Die Reaktionslösung wurde daher zunächst in Wasser verdünnt und anschließend die Färbelösung zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt. Hohe Nukleotidkonzentrationen verlängerten zudem die Farbentwicklungszeit. Dies wurde im besonders hohen Maße beim Nukleotid 5'-CMP beobachtet (Neudorf 2013). Dieses Problem wurde durch eine Verlängerung der Inkubationszeit mit der Färbelösung von 10 auf 30 Minuten umgangen.

3.1.8 Enzymologische Charakterisierung

In initialen Experimenten mit der ^{Dm}cN3B und dem Substrat 5'-CMP wurde beobachtet, dass es zu einem Verlust der Enzymaktivität innerhalb weniger Minuten kam. Dieser Aktivitätsverlust wurde jedoch durch die Verwendung von silanisierten Reaktionsgefäße verhindert (s. 5.6.5; Daten nicht gezeigt). Die Silanisierung reduziert die Anheftung hydrophober Bereiche von Proteinen an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes und damit eine etwaige Inaktivierung. Daher wurden für alle darauffolgenden Analysen silanierte Reaktionsgefäße verwendet (LoBind-Gefäße, Eppendorf®). Da bereits gezeigt wurde, dass zytosolische 5'-Nukleotidasen

Magnesiumionen für ihre Aktivität benötigen (s. 2.3.2), wurde die Aktivität der D^m cN3B mit 5'-CMP unter Standardreaktionsbedingungen zunächst in Gegenwart von Magnesiumacetat bestimmt (s. 5.6.5). In einem weiteren Ansatz wurde das Enzym zunächst zehn Minuten mit EDTA vorinkubiert und dann ebenfalls die Aktivität gegenüber 5'-CMP bestimmt. Durch die Zugabe von EDTA wurde die Aktivität der D^m cN3B nahezu vollständig inhibiert (1,5% Restaktivität, s. Abb. 3.6). Das *D. melanogaster*-Enzym ist also ebenfalls magnesiumabhängig. Anschließend an die EDTA-Behandlung wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von Magnesiumionen wieder zu ca. 75% hergestellt. Der Verlust des Magnesiumions führte somit nicht zu einer irreversiblen Denaturierung der D^m cN3B. Vorversuche mit gereinigter D^m cN3B aus S2-Zellextrakt zeigten ein pH-Optimum der 5'-Nukleotidaseaktivität zwischen 7,0 bis 7,5, bei einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,1. Saurere, bzw. basischere Bedingungen führten zu drastischen Aktivitätsverlusten (90% Aktivitätsverlust bei pH 5,0; Buschmann 2010).

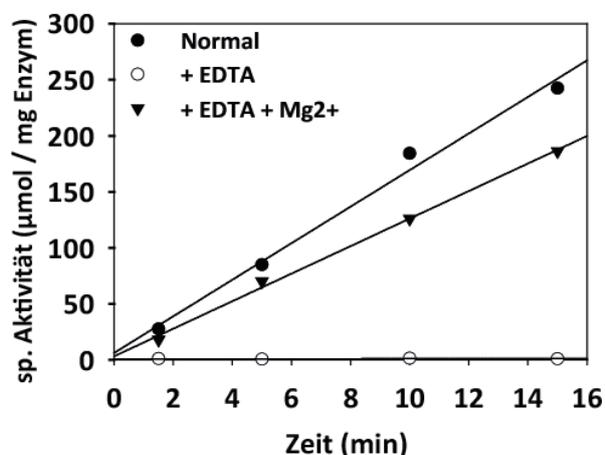


Abb. 3.6 Die 5'-Nukleotidaseaktivität der D^m cN3B ist magnesiumabhängig. Die Freisetzung von Orthophosphat durch die D^m cN3B wurde mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstest ermittelt. Im dargestellten Produkt-Zeit-Diagramm sind folgende Kinetiken mit jeweils 50 ng Enzym und 1 mM 5'-CMP erfasst: ●, Reaktionsmix mit 2,5 mM Magnesiumacetat; ○, Reaktionsmix mit D^m cN3B, das mit 10 mM EDTA 10 min vorinkubiert wurde; ▲, Reaktionsmix, wie ●, jedoch mit Zugabe von 12,5 mM Magnesiumacetat nach Vorinkubation.

Die Zugabe von Reduktionsmitteln, wie DTT oder Glutathion, hatten keinen stimulierenden Effekt auf die Aktivität des Enzyms. Im Gegenteil, die Aktivität verringerte sich um 10% (Daten nicht gezeigt). Auch die Zugabe eines Oxidationsmittels, wie von oxidiertem Glutathion (GSSG), führte nicht zu Änderungen der Enzymaktivität. Die D^m cN3B ist somit nicht redoxempfindlich, und es wurde auf eine Zugabe von Reduktionsmittel während der Reinigung und Charakterisierung verzichtet. Die D^m cN3B wurde außerdem durch sehr hohe Salzkonzentrationen

gehemmt (halbmaximale Enzymaktivität bei 650 mM Kaliumacetat, maximale Enzymaktivität bei 150 mM) und wurde daher bei einer Salzkonzentration von 150 mM Kaliumacetat vermessen. Wiederholte Frier-Tau-Zyklen führten ebenfalls zu Aktivitätsverlusten, so dass die Lagerung der $^{Dm}cN3B$ in Aliquots bei $-80^{\circ}C$ erfolgte und jedes Aliquot nur zweimal verwendet wurde (entspricht maximal zwei Frier-Tau-Zyklen).

3.1.9 Die $^{Dm}cN3B$ ist m^7GMP spezifisch

Die bekannten 5'-Nukleotidasen katalysieren spezifisch die Dephosphorylierung von 5'-NMPs und diskriminieren zwischen Purin- und Pyrimidinnukleotiden, sowie Desoxy- und Ribonukleotiden (s. 2.1). Die 5'-Nukleotidase $^{Dm}cN3B$ ist ein Homologes der pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidasen. Das aus S2-Zellextrakt präparierte Enzym wies jedoch hohe Umsatzraten mit m^7GMP auf, einem Purinnukleotid. Dieses Paradoxon wurde zunächst durch die Messung der 5'-Nukleotidaseaktivität der rekombinanten $^{Dm}cN3B$ mit verschiedenen Substraten untersucht (s. 5.6.4-5).

Es wurden die 5'-Ribonukleotide m^7GMP , GMP, CMP, AMP und UMP in verschiedenen Konzentrationen mit dem Enzym inkubiert und die Dephosphorylierung über die Zeit gemessen. Die Menge an freigesetztem Orthophosphat wurde mit dem oben beschriebenen colorimetrischen Dephosphorylierungstest ermittelt. Da es sich bei dem verwendeten Test um eine diskontinuierliche Messmethode handelte, konnte damit nur eine Endpunktbestimmung durchgeführt werden. Aus den erhaltenen Werten wurden Produkt-Zeit-Kurven erstellt, die die freigesetzte molare Menge an Orthophosphat pro Menge an eingesetztem Enzym über die Zeit aufzeigten (s. Abb. 3.7.A). Pro Kinetik wurden so viele Zeitpunkte gemessen, dass mindestens vier Punkte im linearen Bereich der Umsatzkurve lagen. Mit fortschreitender Zeit sank die Umsatzrate und die Kurve näherte sich einer konstanten Produktkonzentration an. Unter Substratsättigung wurde ein fast 90%iger Umsatz festgestellt. Jede Kinetik wurde mindestens zweimal und bis zu viermal wiederholt. Die Freisetzung von Orthophosphat aus den getesteten 5'-NMPs durch die $^{Dm}cN3B$ erfolgte linear zur

eingesetzten Enzymmenge. Die $^{Dm}cN3B$ wurde nicht durch die Produkte der Reaktion inhibiert.

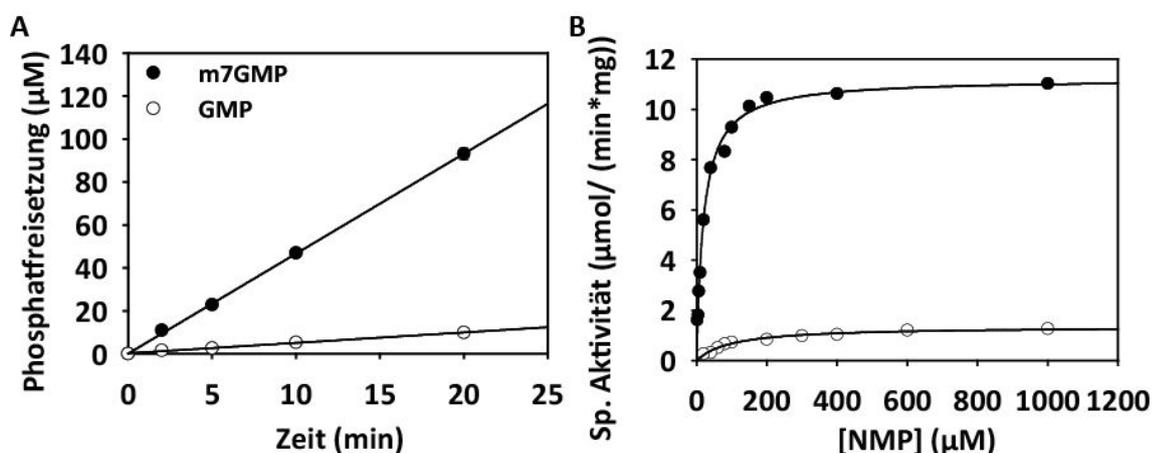


Abb. 3.7 Die $^{Dm}cN3B$ ist m^7GMP spezifisch. A) Produkt-Zeit-Kurven für den Umsatz von m^7GMP und $5'-GMP$ katalysiert durch $^{Dm}cN3B$. Das Enzym setzt bevorzugt m^7GMP um. Es wurden 50 ng Enzym mit 200 μM $5'-NMP$ unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden aus dem Reaktionsansatz Proben entnommen und deren enzymatische Aktivität durch Zugabe der Malachit-Grün-Färbelösung gestoppt. Die Absorption der Proben wurde bei 630 nm bestimmt und die entsprechende Phosphatkonzentration mit Hilfe einer Eichgerade ermittelt. Die daraus berechnete freigesetzte Phosphatkonzentration wurde gegen die Zeit aufgetragen. Durch lineare Regression wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v bestimmt. **B)** v -S-Diagramm der $^{Dm}cN3B$ für m^7GMP und $5'-GMP$. Die erhaltenen Kurven wurden nach Michaelis-Menten (Formel 2) ausgewertet (Sigma Plot® 12.5). ●, m^7GMP ; ○, $5'-GMP$.

Um die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v im *steady state* zu bestimmen, wurden die Anstiege der Produkt-Zeit-Kurven im linearen Bereich durch lineare Regression bestimmt. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden dann als Funktion der Substratkonzentration in einem Diagramm aufgetragen und die *steady state*-Parameter aus der erhaltenen Hyperbolen nach der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (s. Abb. 3.7.B; SigmaPlot12.5®; Michaelis et al. 2011):

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Formel 2})$$

mit v , als Reaktionsgeschwindigkeit, V , als „maximaler“ Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$, als eingesetzte Substratkonzentration und K_M , als Michaelis-Menten-Konstante.

Die erhaltenen katalytischen Parameter für die $5'$ -Nukleotidaseaktivität der $^{Dm}cN3B$ mit verschiedenen $5'$ -Nukleotiden wurden in Tab. 3.3 zusammengefasst. Die katalytische Effizienz eines Enzyms wird durch den k_{cat}/K_M -Wert angegeben, die

Spezifitätskonstante. Die Obergrenze des k_{cat}/K_M -Wertes ist die diffusionskontrollierte Begegnung vom Enzym mit seinem Substrat und liegt im Bereich von 10^8 bis $10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Anhand der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) wurde deutlich, dass die rekombinante Dm^{cN3B} das Substrat m^7GMP um einen Faktor 60 gegenüber $5'$ -GMP bevorzugt. Das Enzym wies einen K_M -Wert für m^7GMP von $12\pm 2 \mu\text{M}$ auf und setzte annähernd 7 Moleküle m^7GMP pro Sekunde um (k_{cat}). Das Substrat $5'$ -GMP wurde vergleichsweise sehr viel langsamer umgesetzt, mit nur ca. einem Molekül pro Sekunde. Auch der K_M -Wert für $5'$ -GMP war ca. 10fach erhöht mit knapp $100 \mu\text{M}$. Das ist deswegen bemerkenswert, da sich diese beiden Guaninnukleotide strukturell sehr ähnlich sind und das Enzym dennoch so distinkt zwischen diesen beiden Substraten unterscheiden kann. Die mit dem rekombinanten Enzym erhaltenen K_M -Werte stimmten gut mit den Werten der aus Extrakt gereinigten Dephosphorylierungsaktivität überein (Buschmann 2010): m^7GMP $K_{M,\text{app}} 3 \mu\text{M}$; $5'$ -GMP $K_{M,\text{app}} 100 \mu\text{M}$.

Tab. 3.3 Die enzymkinetischen Parameter der Dm^{cN3B} mit ausgewählten $5'$ -NMPs.

$5'$ -(d)NMP	K_M (μM)	K_i (mM) ¹	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
m^7GMP	12 ± 2		$11 \pm 0,7$	6,6	553600
GMP	102 ± 11		$1,5 \pm 0,2$	0,9	8900
CMP	48 ± 6		$21 \pm 1,6$	12,7	264300
UMP	91		4	2,4	26600
dUMP	264		4,5	2,7	10277
AMP	32	2,1	0,5	0,3	9400

¹, K_i , inhibitorische Konstante ermittelt nach Haldane (Reed et al. 2010).

Als Homologes der pyrimidinspezifischen $5'$ -Nukleotidasen dephosphorylierte Dm^{cN3B} auch $5'$ -CMP sehr effektiv, und wies hierfür einen zweifach höheren k_{cat} -Wert als für m^7GMP auf. Jedoch war der K_M -Wert mit $48\pm 6 \mu\text{M}$ deutlich höher, sodass der k_{cat}/K_M -Wert für m^7GMP am höchsten war, sprich die katalytische Effizienz der Dm^{cN3B} war für m^7GMP am besten. Andere $5'$ -NMPs wie UMP, GMP und AMP waren mit k_{cat}/K_M -Werten um 10^3 bis $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ deutlich schlechtere Substrate für die *D. melanogaster*-Nukleotidase als $5'$ -CMP und m^7GMP , die k_{cat}/K_M -Werte bis $5\cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ aufwiesen.

Die $^{Dm}cN3B$ wurde außerdem mit 5'-dUMP inkubiert. Auch hier katalysierte sie die Dephosphorylierung dieses Desoxynukleotids mit einer katalytischen Effizienz von $1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Damit ist 5'-dUMP sogar ein besseres Substrat als 5'-AMP und 5'-GMP und nur um Faktor zwei schlechter als 5'-UMP. Die $^{Dm}cN3B$ ist somit eine $m^7\text{GMP}$ -spezifische 5'-Nukleotidase, die jedoch auch eine Präferenz für Pyrimidinnukleotide aufweist, insbesondere 5'-CMP.

3.1.10 5'-AMP wirkt in hohen Konzentrationen inhibierend

Die 5'-Nukleotidaseaktivität der $^{Dm}cN3B$ wurde durch höhere 5'-AMP-Konzentrationen gehemmt (s. Abb. 3.8).

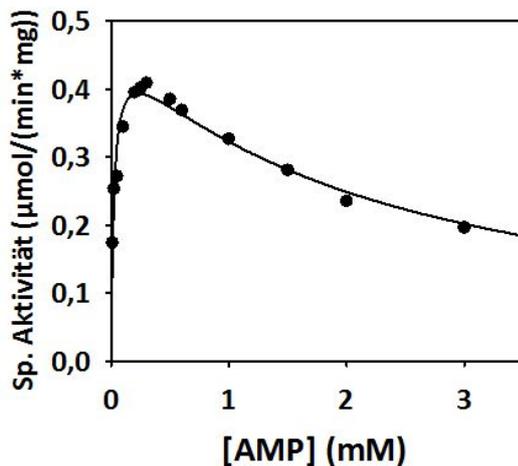


Abb. 3.8 5'-AMP wirkt in hohen Konzentrationen inhibierend auf $^{Dm}cN3B$. Dargestellt ist das v-S-Diagramm von $^{Dm}cN3B$ mit 5'-AMP als Substrat. Der Umsatz folgte nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik. In hohen Konzentrationen inhibierte 5'-AMP die $^{Dm}cN3B$ -Aktivität. Mit Hilfe der Haldane-Gleichung für die Substratüberschusshemmung wurde eine Regression durchgeführt und ein K_i -Wert von ca. 2 mM berechnet (Reed et al. 2010; Sigma Plot® 12.5).

Die v-S-Charakteristik konnte daher nicht nach Michaelis-Menten ausgewertet werden. An die Kurve wurde stattdessen die Gleichung der Substratüberschusshemmung nach Haldane angepasst (Reed et al. 2010):

$$v = \frac{V'}{([S] + K'_M + \frac{[S]^2}{K_i})} \quad (\text{Formel 3})$$

mit K_i , als inhibitorischer Konstante.

Durch den Term $[S]^2$ wird zum Ausdruck gebracht, dass bei hohen Substratkonzentrationen nicht etwa V erreicht wird, sondern die Reaktionsgeschwindigkeit gegen Null geht. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme,

dass ein zweites 5'-AMP-Molekül an den Enzym-AMP-Komplex binden kann und damit zu einer verringerten Enzymaktivität führt (analog zur unkompetitiven Inhibition). Hierbei stellt der Term K_i die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für 5'-AMP an der zweiten Bindetasche vom Enzym-AMP-Komplex dar. Durch die Anpassung der Kurve nach Formel 3 ergaben sich für die $^{Dm}cN3B$ für das Substrat 5'-AMP ein apparenter K_M -Wert von 32 μ M und ein K_i -Wert von 2,1 mM.

Eine weitere Möglichkeit, den Aktivitätsverlust zu erklären, wäre die bei einigen 5'-Nukleotidasen beobachtete Phosphotransferaseaktivität gewesen (s. 2.3.2). Hierbei wird das kovalent ans Enzym gebundene Phosphat zurück auf einen Phosphatakzeptor übertragen. Es wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass $^{Dm}cN3B$ tatsächlich fähig ist Nucleosiddiphosphate zu binden und umzusetzen (s. 3.1.11). Theoretisch wäre also die Bildung eines ADP-Moleküls denkbar. Jedoch wurde durch die Zugabe von Apyrase (5 U, Sigma Aldrich), einer NTPase/NDPase, die Inhibition bei hohen 5'-AMP-Konzentrationen nicht aufgehoben, was darauf schließen lässt, dass die Bildung von ADP nicht die Ursache für die Inhibition ist. Die intrazelluläre 5'-AMP-Konzentration kann durch den Abbau des in der Zelle vorliegenden ATPs tatsächlich 2 mM erreichen (s. 3.5.5). Damit ist diese Hemmung vermutlich kein Artefakt, das auf unphysiologische Bedingungen zurückzuführen ist. Im Gegenteil, die Substratinhibition wäre eine Regulationsmöglichkeit, um die Nucleotidpoolhomöostase unter ATP-depletierenden Bedingungen in der Zelle zu gewährleisten, beispielsweise bei Sauerstoffmangel. Dann nämlich ist dem energiesparenden Prozess des Nucleotidrecyclings aus ihren 5'-Nucleosidmonophosphaten der Vorzug zu geben. Durch die Inhibition kataboler Enzyme, wie der $^{Dm}cN3B$, wird die ausreichende Versorgung mit 5'-NMPs gesichert.

3.1.11 Die $^{Dm}cN3B$ dephosphoryliert auch m^7GDP

Das 5'-cap der mRNAs kann entweder durch das Enzym DcpS direkt zu m^7GMP abgebaut werden, oder durch die kombinierte Aktivität der *decapping*-Proteine Dcp2 und Dcp1 (s. 2.5). Dcp2 spaltet das 5'-cap in ein 5'-p-Polynucleotid und m^7GDP (Parker und Song 2004). Es wurde gezeigt, dass humanes DcpS und sein Homologes in Hefe (Dcs1) auch in der Lage sind m^7GDP zu m^7GMP und Phosphat abzubauen, zumindest in

Gegenwart von ATP (Taverniti und Séraphin 2015; van Dijk et al. 2003). Im Widerspruch dazu wurde in Wypijewska et al. 2012 nur von einer hochaffinen Bindung des m^7GDP s durch rekombinantes DcpS berichtet, jedoch wurde keine Dephosphorylierungsaktivität beobachtet. Sowohl humanes Dcp2 als auch DcpS besitzen Homologe in *Drosophila melanogaster* (CG6169 und CG2091). Bei einer Inkubation von 5'-cap-markierter RNA in *D. melanogaster*-Embryoextrakt wurde Evidenz für eine DcpS-Aktivität gefunden (Buschmann 2010). Eine Freisetzung von m^7GDP wurde in diesem Experiment jedoch nicht beobachtet. Das kann entweder an einer fehlenden Dcp2-Aktivität liegen oder freigesetztes m^7GDP wird sofort weiter zu m^7GMP und Phosphat umgesetzt. Die D^m cN3B wurde testweise mit m^7GDP (Jena Bioscience) inkubiert. Überraschenderweise dephosphorylierte die 5'-Nukleotidase m^7GDP zu 7-Methylguanidin und Phosphat. Die Rate war zwar 32fach niedriger im Vergleich zum Substrat m^7GMP , jedoch substantiell (s. Abb. 3.9.A). Die Behandlung mit Pyrophosphatase (5 U, Fermentas) hatte keinen beschleunigenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, auch wies die präparierte D^m cN3B keine kontaminierende Pyrophosphataseaktivität auf (s. Abb. 3.9.B).

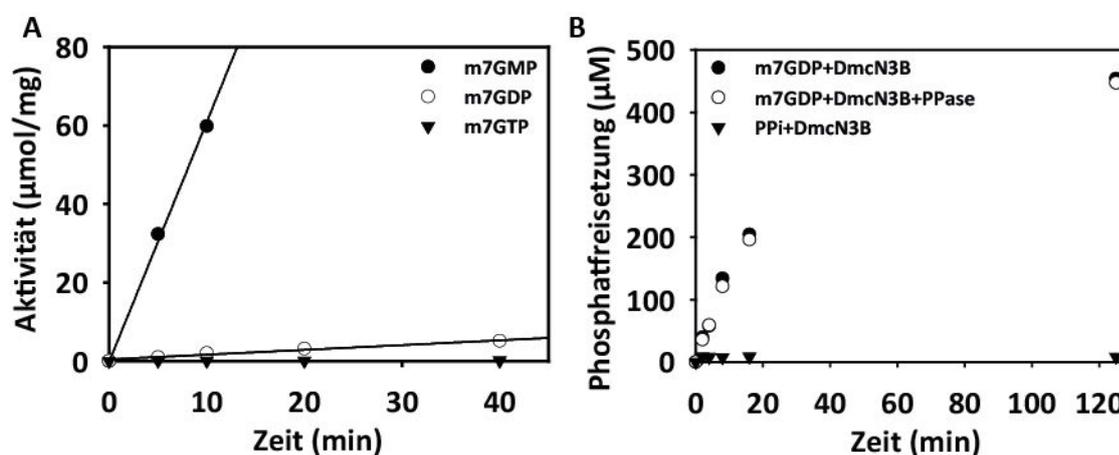


Abb. 3.9 7-Methyl-GDP ist ein Substrat der D^m cN3B. **A)** Produkt-Zeit-Diagramm der D^m cN3B mit verschiedenen m^7G -Nucleotiden. Es wurden jeweils 500 μM m^7GMP , m^7GDP und m^7GTP mit D^m cN3B unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Für die Messung des m^7GMP -Umsatzes wurden 2 $ng/\mu L$ D^m cN3B eingesetzt. Für den Umsatz von m^7GDP und m^7GTP wurden 100 $ng/\mu L$ Enzym eingesetzt. **B)** Die Zugabe von Pyrophosphatase zum Reaktionsansatz hatte keine beschleunigende Wirkung auf den Umsatz von m^7GDP . Es wurden 250 μM m^7GDP mit 100 $ng/\mu L$ D^m cN3B unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Der Reaktionsansatz mit ‚+PPase‘ enthielt außerdem 5 U Pyrophosphatase. PPI, Pyrophosphat (250 μM).

Mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungstest wurde zudem doppelt so viel Orthophosphat detektiert, wie $m^7\text{GDP}$ eingesetzt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass das α - und β -Phosphat des $m^7\text{GDP}$ s sukzessive abgespalten und nicht als Pyrophosphat freigesetzt wurden. $^{Dm}cN3B$ wurde auch mit $m^7\text{GTP}$ (Jena Bioscience) inkubiert. Hier wurde jedoch keine Dephosphorylierung festgestellt.

Der Abbau von $m^7\text{GDP}$ durch die $^{Dm}cN3B$ war auch spezifisch für die methylierte Variante von GDP. Nicht-methyliertes GDP wurde mit einer 40fach schlechteren Rate umgesetzt als $m^7\text{GDP}$. Neben diesen beiden Substraten wurde auch die Dephosphorylierung von CDP getestet. Hier wurde ein sehr geringer Umsatz beobachtet, der mit einer 200fach schlechteren Rate im Vergleich zu $5'$ -CMP vorstatten ging und auch schlechter als der Umsatz von $m^7\text{GDP}$ (Faktor 13 schlechter). Für die Zelle ist der Abbau von $m^7\text{GDP}$ bedeutsam (s. 4.3). Es muss verhindert werden, dass dieses modifizierte Nukleotid versehentlich in Nukleinsäuren eingebaut wird. In *D. melanogaster* stellt die gefundene Aktivität der $^{Dm}cN3B$ eine Möglichkeit dar, auch $m^7\text{GDP}$ aus dem Nukleotidpool zu entfernen.

3.1.12 Die $^{Dm}cN3B$ weist keine Phosphotransferase-Aktivität auf

Die humane $cN3A$ -Nukleotidase ist ebenfalls ein Homologes der $^{Dm}cN3B$. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde mit der $^{Hs}cN3A$ zumindest *in vitro* eine Phosphotransferase-Aktivität nachgewiesen (Amici et al. 1997). Daher wurde untersucht, ob auch die *D. melanogaster*-Nukleotidase diese Reaktion katalysieren kann (s. 5.6.10). Um einen Phosphattransfer nachzuweisen, wurde als Phosphatdonor $5'$ - ^{32}P -CMP gewählt (s. 5.6.2). Als Phosphatakzeptor wurde 7-Methylguanosin (Jena Bioscience) eingesetzt. Es wurde zunächst der Umsatz des ^{32}P -markierten $5'$ -CMPs in Abwesenheit des Phosphatakzeptors bestimmt. Hierfür wurde das Enzym mit dem Substrat inkubiert, nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, und die Reaktion wurde mit EDTA abgestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (5.6.3). Nach 28 Minuten Reaktionszeit waren 62% des $5'$ -CMPs dephosphoryliert (s. Abb. 3.10.A und B). Wurde der Reaktion 7-Methylguanosin beigemischt, wurde die Dephosphorylierung vom ^{32}P -markierten $5'$ -

CMP konzentrationsabhängig gehemmt. Es wurde jedoch kein Signal auf Höhe von m^7GMP detektiert. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu betrachten. Zum einen wurde die Phosphotransferase-Reaktion der humanen cN3A zwar mit 5'-CMP als Donor gezeigt, als Akzeptor wurde jedoch Uridin im zehnfachen Überschuss verwendet (Amici et al. 1997). Auch die von Amici et al. 1997 tatsächlich eingesetzte Enzymmenge konnte nicht ermittelt werden, da für diese Experimente aktive Fraktionen einer konventionellen, chromatographischen Reinigung aus Erythrozyten verwendet wurden. Zum anderen wurde die Reaktion 120 Minuten lang inkubiert und hierbei eine maximale Übertragungsrate von nur 25% erzielt. Die Benutzung von 7-Methylguanodin als Phosphatakzeptor war zudem nicht ideal, da das eventuell entstehende m^7GMP durch die $^{Dm}cN3B$, aufgrund ihrer hohen Spezifitätskonstante für m^7GMP , sofort wieder dephosphoryliert werden würde.

Das Experiment wurde daher wiederholt, die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte allerdings mittels *ion pair reversed phase* HPLC (IP-RP-HPLC) über eine C18-Säule (s. Abb. 3.10.C, s. 5.6.9). Hierfür wurde 5'-CMP als Phosphatdonor und Uridin als Phosphatakzeptor eingesetzt. Auch nach 120 Minuten Inkubationszeit wurde jedoch kein 5'-UMP bei der erwarteten Retentionszeit detektiert. Daher weist die $^{Dm}cN3B$ vermutlich keine Phosphotransferase-Aktivität auf (s. 4.2).

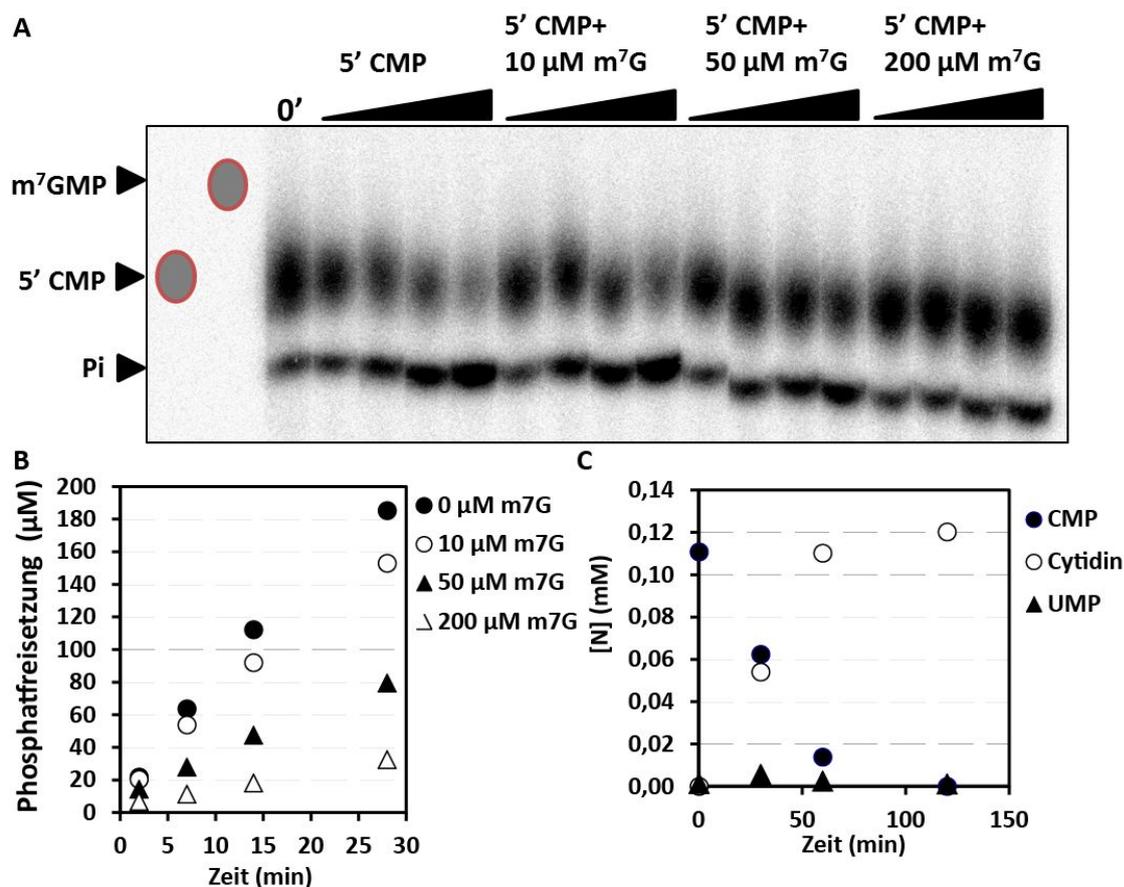


Abb. 3.10 ^{Dm}cN3B zeigte keine Phosphotransferase-Aktivität. **A und B**) 5'-³²P-CMP (300 μM) wurde mit ^{Dm}cN3B (2 ng/μL) unter Standardreaktionsbedingungen (s. 5.6.5) inkubiert, nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA abgestoppt. Die Analyse der Produkte erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und *phosphor storage screening* (s. 5.6.3). Das Experiment wurde in Gegenwart steigender 7-Methylguanosin-Konzentrationen (10, 50, 200 μM) wiederholt. Die angezeigten Laufhöhen in A wurden mit nicht-radioaktiv markierten Standards über ihre UV-Absorption ermittelt, außer Phosphat (Pi). Die Laufhöhe von Phosphat wurde über radioaktives ³²P ermittelt. In B wurden die radioaktiven Signale von A mit ImageQuant® quantifiziert. **C**) 5'-CMP (100 μM) wurde mit Uridin (1 mM) und mit 5 ng/μL ^{Dm}cN3B unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese mittels IP-RP-HPLC über eine C18-Säule analysiert (s. 5.6.8-9).

3.2 Die humanen zytosolischen Pyrimidin-Nukleotidasen

Durch die Entdeckung der ^{Dm}cN3B und ihrer unerwarteten Aktivität gegenüber m⁷GMP lag es nahe, auch die humanen Homologen, die ^{Hs}cN3A und die ^{Hs}cN3B, auf m⁷GMP-Umsatz zu prüfen. Da der ^{Hs}cN3A keine Aktivität gegenüber Purinnukleotiden nachgewiesen wurde (Amici et al. 1997; Paglia und Valentine 1975), wurde zunächst die ^{Hs}cN3B rekombinant dargestellt, gereinigt und näher charakterisiert.

3.2.1 ^{Hs}cN3B, eine putative m⁷GMP-spezifische 5'-Nukleotidase

Eine m⁷GMP-dephosphorylierende Aktivität wurde bereits in K562-Zellextrakt beobachtet, was die Existenz einer m⁷GMP-spezifischen 5'-Nukleotidase im Menschen vermuten ließ (Buschmann 2010; Wang und Kiledjian 2001). Da die ^{Hs}cN3A bereits gut charakterisiert wurde, lag die Vermutung nahe, dass ^{Hs}cN3B im Menschen für den Umsatz von m⁷GMP verantwortlich ist, ein bis jetzt nicht näher charakterisiertes Protein. Um diese These zu prüfen, wurde zunächst die cDNA für die ^{Hs}cN3B aus HEK (*human embryonic kidney*) 293-Zellen durch RT-PCR amplifiziert (s. 5.4.1-2). Das Gen der ^{Hs}cN3B weist 10 Exons auf (www.ensembl.org; NT5C3L). Durch alternatives Spleißen entstehen hieraus 16 annotierte Transkripte, aber lediglich vier davon ergeben ein Translationsprodukt. Für die Charakterisierung der ^{Hs}cN3B wurde die cDNA der längsten Isoform 1 amplifiziert (NM 052935.4) und in einen Expressionsvektor kloniert und das Protein in *E. coli* rekombinant erzeugt (s. 5.4.3 und 5.5.1-2). Die Reinigung der humanen cN3B bis zur Homogenität erfolgte analog zum *D. melanogaster*-Enzym (s. Abb. 3.4). Die Proteinkonzentration der gereinigten ^{Hs}cN3B betrug 29 µM (s. 5.5.3), und eine analytische Ultrazentrifugation ergab ein natives Molekulargewicht von 34 kDa in Lösung (s. Abb. 3.11). Bei einem vorhergesagten Molekulargewicht von 34,4 kDa liegt die ^{Hs}cN3B, wie die ^{Dm}cN3B, in Lösung als Monomer vor.

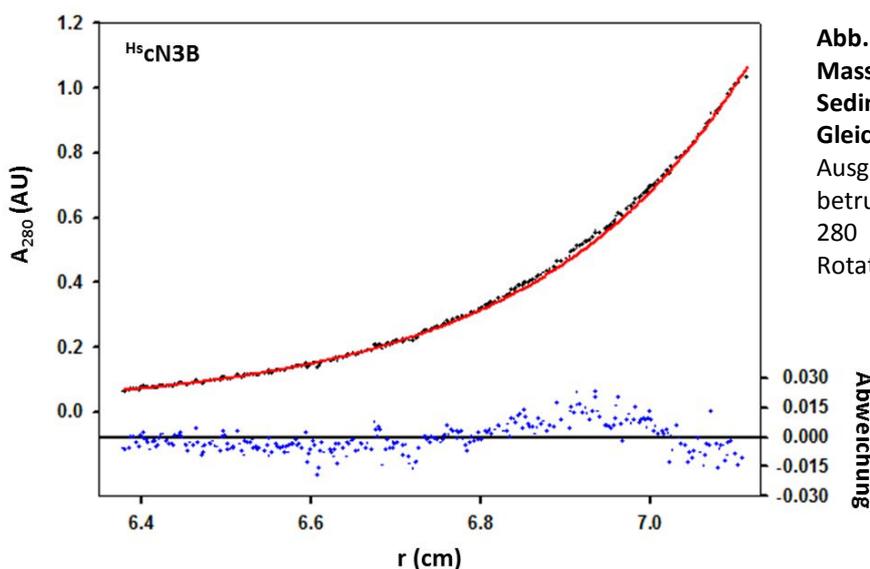


Abb. 3.11 Bestimmung der molaren Masse der ^{Hs}cN3B durch ein Sedimentationsexperiment im Gleichgewicht. Die Ausgangskonzentration der ^{Hs}cN3B betrug 1 mg/mL. A, Absorption bei 280 nm; r, Distanz vom Rotationszentrum.

Die $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ ist im Gegensatz zur $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ redoxempfindlich (Daten nicht gezeigt). Für die Vermessung der Nukleotidaseaktivität wurde daher unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet (3 mM DTT, s. 4.2). Maximale Aktivität mit dem Substrat 5'-CMP wurde bei einem pH-Wert von 7,4 erreicht, und eine Behandlung mit EDTA im Überschuss inhibierte die Enzymaktivität (Restaktivität von 0,5%; Daten nicht gezeigt). Letzteres bedeutet, dass auch die $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ ein magnesiumabhängiges Enzym ist.

3.2.2 $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ katalysiert auch die $m^7\text{GMP}$ -Dephosphorylierung

Die 5'-Nukleotidaseaktivität der $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ wurde mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungstest bestimmt (s. 5.6.4-5). Nach Start der Reaktion durch Zugabe von rekombinanter $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ zu $m^7\text{GMP}$ verlief die Dephosphorylierung zunächst nicht linear, sondern mit verlangsamter Reaktionsgeschwindigkeit (s. Abb. 3.12). Erst nach Umsatz von ca. 20 μM Substrat wurde eine linear zeitabhängige Dephosphorylierung erreicht. Eine ähnliche *lag*-Phase wurde auch für das Substrat 5'-CMP beobachtet. Dieses Phänomen wurde durch die Verringerung der Reaktionstemperatur für beide getesteten 5'-Nukleotide noch ausgeprägter (Daten nicht gezeigt). Durch Zugabe von 50 μM Phosphat zum Reaktionsstart wurde diese *lag*-Phase jedoch aufgehoben und die Linearität wiederhergestellt (s. Abb. 3.12). Zur Bestimmung der Nukleotidaseaktivität wurde daher zum Reaktionsstart immer 50 μM Phosphat vorgelegt.

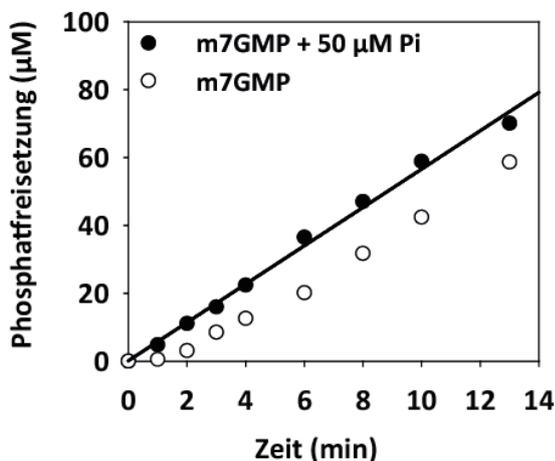


Abb. 3.12 Der Umsatz von $m^7\text{GMP}$ durch $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ verlief nicht linear, sondern wies eine anfängliche *lag*-Phase auf. Es wurden 100 ng Enzym mit 500 μM Substrat unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert und die freigesetzte Menge an Orthophosphat mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungsassay bestimmt. Unter Standardbedingungen wurde eine *lag*-Phase zu Beginn der Reaktion festgestellt. Die Linearität wurde durch Zugabe von 50 μM Orthophosphat zum Reaktionsstart wieder hergestellt.

Die ^{Hs}cN3B wurde mit verschiedenen 5'-NMPs inkubiert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_M nach Michaelis-Menten ermittelt (s. Tab. 3.4). Daraus wurden die enzyspezifischen Parameter k_{cat} und k_{cat}/K_M berechnet.

Tab. 3.4 Kinetische Parameter der ^{Hs}cN3B mit verschiedenen 5'-NMPs als Substrat.

5'-NMP	K_M (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
m ⁷ GMP	8±2	0,81±0,13	0,5	58000
GMP	355±23	0,13±0,04	0,07	210
CMP	80±7	12±2,1	6,9	87000
UMP	440	10,7	6,1	14000
AMP	460	0,07	0,04	88

Die ^{Hs}cN3B wies den niedrigsten K_M -Wert für m⁷GMP auf mit 8±2 μM . Dieser Wert war noch niedriger als der des homologen Enzyms aus *D. melanogaster*. Im Vergleich zur ^{Dm}cN3B war jedoch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des humanen Enzyms für den Umsatz von m⁷GMP fast um das 13fache verringert. Besonders hohe V_{max} -Werte wurden für die Substrate 5'-CMP und 5'-UMP erreicht. Das hatte zur Folge, dass die ^{Hs}cN3B die höchste katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für 5'-CMP zeigte, nicht für m⁷GMP. Das humane Enzym unterschied außerdem noch stringenter zwischen methyliertem und nicht-methyliertem 5'-GMP und bevorzugte m⁷GMP um einen Faktor von 280 gegenüber 5'-GMP. Bemerkenswerterweise wies die ^{Hs}cN3B im Gegensatz zur ^{Dm}cN3B ein sehr schmales Substratspektrum auf. Hierbei waren 5'-CMP und m⁷GMP die deutlich besten Substrate mit k_{cat}/K_M -Werten um $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Das Substrat 5'-UMP wurde bereits deutlich schlechter umgesetzt, was auf einen hohen K_M -Wert von 440 μM zurückzuführen ist. Für die Substrate 5'-AMP und 5'-GMP wurden sowohl hohe K_M -Werte (460 und 355±23 μM), als auch niedrige V_{max} -Werte (0,07 und 0,13±0,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) ermittelt. Dadurch erreichte die katalytische Effizienz für diese beiden Substrate lediglich Werte von 88 bis 210 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Es wurde keine inhibierende Wirkung von hohen Konzentrationen von 5'-AMP festgestellt.

Es wurde geschlussfolgert, dass es sich bei der ^{Hs}cN3B um eine m⁷GMP- und pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase handelt. Außerdem wurde angenommen, dass die ^{Hs}cN3B tatsächlich das homologe Enzym zur ^{Dm}cN3B ist.

3.2.3 ^{Hs}cN3A kann ebenfalls m⁷GMP dephosphorylieren

Die humane cN3A wurde als pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase beschrieben und setzt hauptsächlich 5'-CMP und 5'-UMP um (s. 2.4.2). Eine Aktivität mit dem Substrat 5'-IMP wurde nicht beobachtet (Paglia und Valentine 1975). Um dennoch die Möglichkeit zu testen, dass auch diese 5'-Nukleotidase in der Lage ist, m⁷GMP umzusetzen, wurde die cDNA der ^{Hs}cN3A aus HEK293-Zell-RNA durch RT-PCR amplifiziert (s. 5.4.1-2). In der Literatur wurden bereits vier Isoformen dokumentiert, die durch alternatives Spleißen des primären Transkriptes entstehen. Das Proteinprodukt der Isoform 3 wurde vorrangig aus Erythrozyten gereinigt und charakterisiert (Marinaki et al. 2001). Daher wurde die cDNA der Isoform 3 in einen Expressionsvektor kloniert und das Protein in *E.coli* rekombinant dargestellt (s.5.4.3 und 5.5.1-2).

Das erzeugte His₆-SUMO-^{Hs}cN3A war in löslicher Form sehr instabil und bildete Aggregate. Insbesondere die Abspaltung des SUMO-Affinitätspeptids führte zum vollständigen Verlust nativen Proteins. Die Reinigung der ^{Hs}cN3A bis zur Homogenität gestaltete sich also schwierig. Durch eine Optimierung der Reinigungsbedingungen war es möglich volllanges, lösliches ^{Hs}cN3A zu präparieren (s. Abb. 3.4). Dies gelang durch die Verwendung von Saccharose im Reinigungspuffer anstatt des zuvor benutzten Glycerins. Glycerin erhöht zwar die Löslichkeit von Proteinen, jedoch auch denaturierter Proteine und wirkt sich dadurch wenig stabilitätsfördernd aus. Saccharose verringert die Löslichkeit geringfügig, stabilisiert jedoch besonders das Peptidrückgrat nativ gefalteter Proteine (Auton et al. 2011). Dadurch blieb ^{Hs}cN3A auch nach Abspaltung des SUMO-Peptides in Lösung. Nach einem weiteren Reinigungsschritt über Heparin-Sepharose wurden nur noch sehr wenige kontaminierende Banden mit höherem Molekulargewicht detektiert. Für die

durchzuführenden Analysen wurde daher die ^{Hs}cN3A-Konzentration densitometrisch über SDS-PAGE-Analyse bestimmt, sie betrug 6,3 μM (s. 5.5.3).

Tab. 3.5 Kinetische Parameter der ^{Hs}cN3A für die Substrate 5'-CMP und m⁷GMP.

5'-NMP	K _M (μM)	V _{max} (μmol•min ⁻¹ •mg ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ •s ⁻¹)
m ⁷ GMP	15	0,5	0,3	22800
CMP	80	15	9,5	118600

Mit der gereinigten ^{Hs}cN3A-Präparation wurde der Umsatz von 5'-CMP und m⁷GMP untersucht und die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} bestimmt (s. Tab. 3.5). Der K_M-Wert für 5'-CMP lag mit 80 μM im Erwartungsbereich, überraschenderweise wurde für m⁷GMP jedoch ein K_M-Wert von ca. 15 μM bestimmt. Diese Werte ähneln denen der ^{Hs}cN3B, die ebenfalls für 5'-CMP einen K_M-Wert von 80 μM aufwies. Der K_M-Wert für m⁷GMP unterschied sich nur um Faktor 2 zwischen ^{Hs}cN3B und ^{Hs}cN3A. Das gereinigte ^{Hs}cN3A setzte 5'-CMP nur 30fach schneller um als m⁷GMP. Vergleicht man die katalytische Effizienz des Enzyms für beide Substrate, bevorzugt die ^{Hs}cN3A das Substrat 5'-CMP um einen Faktor von ca. 5. Da das paraloge Enzym ^{Hs}cN3B hierbei einen Faktor von 1,5 aufweist, kann man annehmen, dass die ^{Hs}cN3A tatsächlich darauf spezialisiert ist, Pyrimidinmonophosphate umzusetzen, dass im Menschen jedoch sowohl ^{Hs}cN3A als auch ^{Hs}cN3B für den Umsatz von m⁷GMP verantwortlich sind.

3.3 ^{Dm}cN2, die zweite zytosolische 5'-Nukleotidase in *D. melanogaster*

3.3.1 Homologiestudien identifizieren das Gen CG32549

Wie in der Einleitung beschrieben, sind im Menschen bereits mehrere zytosolische 5'-Nukleotidasen näher charakterisiert worden. Sucht man mit diesen Proteinsequenzen nach Homologen in *D. melanogaster* (*blast*, *pubmed*-Datenbank) findet man nur zwei Übereinstimmungen. Das Homologe zu den zytosolischen, pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidasen ist die bereits beschriebene ^{Dm}cN3B. Eine zweite zytosolische 5'-Nukleotidase wurde als Homologes der purinspezifischen 5'-Nukleotidase cN2 identifiziert, das Genprodukt von CG32549. Das Gen CG32549 befindet sich auf dem X-

Chromosom (zytogenetische Position 17A10-17A11) und ist circa 20000 Basenpaare lang.

Es wurden bis jetzt sechs Transkripte annotiert, die jedoch nur für vier verschiedene Polypeptide kodieren. Innerhalb eines sehr langen Introns von CG32549 befindet sich noch ein weiteres putatives Gen, CG34328, das nur knapp 500 Basenpaare lang ist und ein theoretisches Translationsprodukt von 133 Aminosäuren erzeugen würde. Ein Homologes zu diesem kleinen Gen wurde nur in der nahverwandten *D. simulans* gefunden, in keinem weiteren Organismus. Es wurden außerdem nur sehr wenige sogenannte *expressed sequence tags* detektiert, die auf die tatsächliche Existenz eines Transkriptes hindeuten.

Durch Auswertung der Daten des modENCODE *Drosophila*-Transkriptom-Projektes und der *FlyAtlas*-Datenbanken wurde ersichtlich, dass auch das Transkript der CG32549 während der gesamten Fliegenentwicklung nachweisbar ist (s. Abb. 3.13.A und B; Flybase-ID: FBlc0000085; Graveley et al. 2011 und FBlc0000157; Chintapalli et al. 2007). Das CG32549-Expressionslevel ist im Vergleich zur ^{Dm}cN3B im Durchschnitt höher während der Fliegenentwicklung und erreicht in L3-Larven ein Expressionsmaximum. Nur während der Embryogenese im Bereich zwischen 2-6 h ist das Expressionslevel von CG32549 niedriger als das der ^{Dm}cN3B. Im Gewebe von adulten Fliegen wurde das meiste Transkript im Rumpf und Fettkörper gefunden und in weiblichen Fliegen zusätzlich in den Spermathecan (s. Abb. 3.13.C und D). Auch im Larven-Fettkörper wurde CG32549 mit sehr hohem Expressionslevel detektiert.

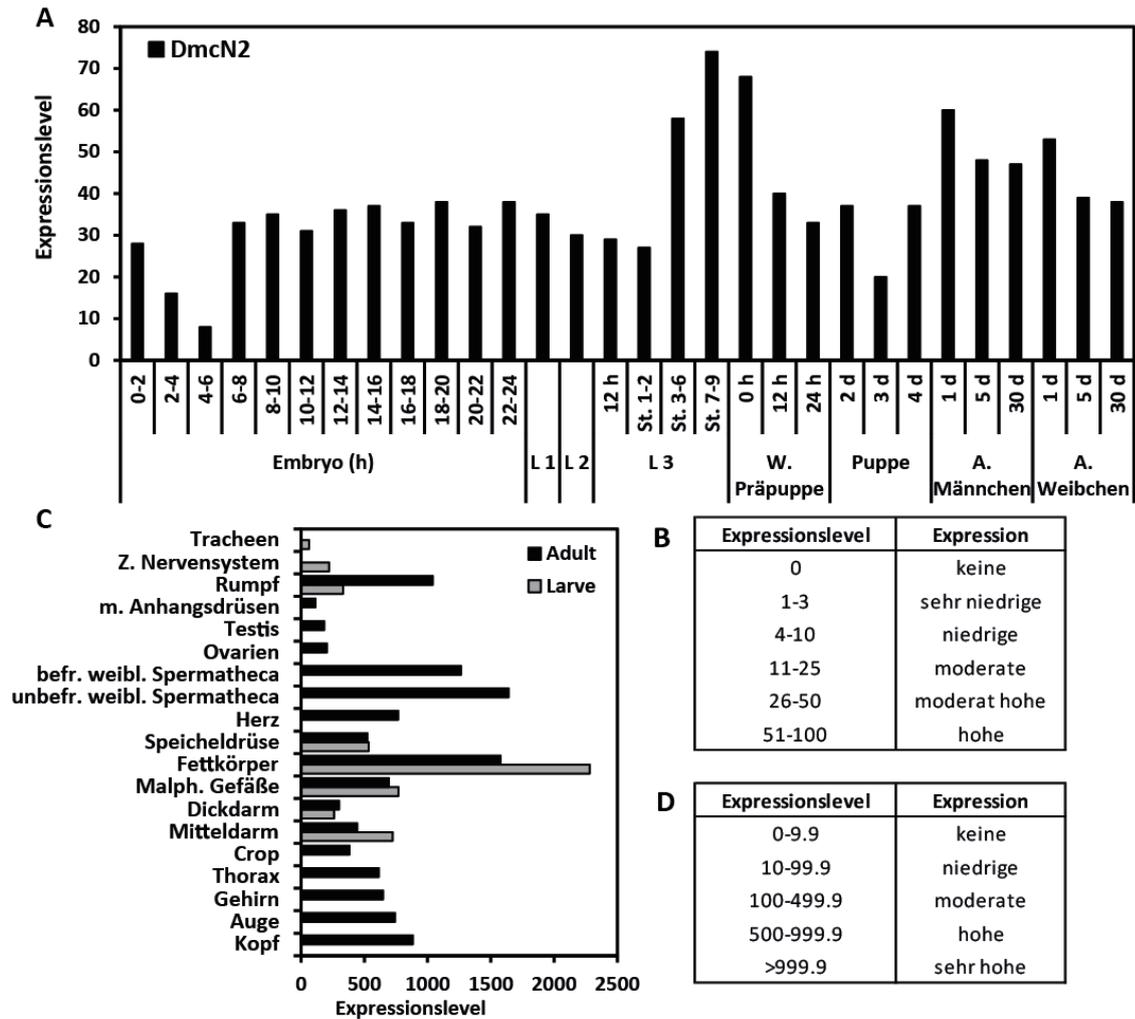


Abb. 3.13 Expressionsprofil des Gens CG32549. Für Details zur Datenauswertung siehe Abb. 3.1. **A und B)** Transkriptexpression von CG32549 während der *D. melanogaster*-Entwicklung. Das Transkript ist in allen untersuchten Stadien nachweisbar mit einer niedrigen bis hohen Expression. Die höchste Expression wurde in L3-Larven detektiert. **C und D)** Gewebespezifische Transkriptexpression in Larven und adulten Tieren. Das Transkript CG32549 wurde insbesondere im Fettkörpergewebe mit sehr hohem Expressionslevel detektiert. L, Larve; W., weiß; A., Adult; Z., Zentrales; m., männliche; befr./unbefr. weibl., befruchtete/unbefruchtete weibliche; Malph., malphigische.

3.3.2 Die rekombinante Darstellung von ^{Dm}cN2

Die cDNA der Transkriptisof orm B der ^{Dm}cN2 wurde in einen Expressionsvektor kloniert und die His₆-SUMO-^{Dm}cN2 rekombinant in *E.coli* erzeugt (s. 5.4.4 und 5.5.1-2). Das Protein wurde analog zur ^{Dm}cN3B zunächst durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Als Kontrolle wurde parallel ein *E. coli*-Ansatz ohne Transformation mit dem Expressionsplasmid mitgeführt und das Lysat ebenfalls einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen, um eine kontaminierende Dephosphorylierungsaktivität auszuschließen. Die 5'-Nukleotidaseaktivität beider Ansätze wurde über die Dephosphorylierung von 5'-IMP mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstestes gemessen. Bereits nach dem ersten Reinigungsschritt durch die Ni-NTA-Chromatographie wurde in den Fraktionen des nichttransformierten Ansatzes kein 5'-IMP-Umsatz mehr detektiert (s. Abb. 3.14.A). Im Gegensatz dazu wurde im *E.coli*-Ansatz, der mit dem Expressionsplasmid transformiert wurde, unter den gleichen Expressions- und Reinigungsbedingungen ein eindeutiges Aktivitätsprofil erhalten (s. Abb. 3.14.B). Die Höhe der gemessenen Aktivität korrelierte zudem mit der Intensität einer Proteinbande in einer SDS-PAGE der getesteten Ni-NTA-Fractionen. Das Protein wies eine molekulare Größe von ca. 88 kDa auf. Das theoretische Molekulargewicht der His₆-SUMO-^{Dm}cN2 beträgt nach Protean® 83,2kDa.

Nach Abspaltung des His₆-SUMO-Tags erfolgte die weitere Reinigung der ^{Dm}cN2 bis zur Homogenität über eine weitere Ni-NTA-Chromatographie, eine MonoQ- und eine Hydroxyapatitchromatographie (s. 5.5.2). Die Fraktionen der finalen Hydroxyapatitchromatographie, die die ^{Dm}cN2 in akzeptablen Mengen enthielten, wurden vereinigt, dialysiert, und die Proteinkonzentration wurde densitometrisch über eine SDS-PAGE-Analyse bestimmt (s. 5.5.3). Die rekombinante ^{Dm}cN2 wies in der SDS-PAGE-Analyse eine molekulare Größe von 60 kDa auf (erwartetes Molekulargewicht 69 kDa, Protean®). Die Konzentration des gereinigten Enzyms betrug 0,9 µM (s. Abb. 3.4).

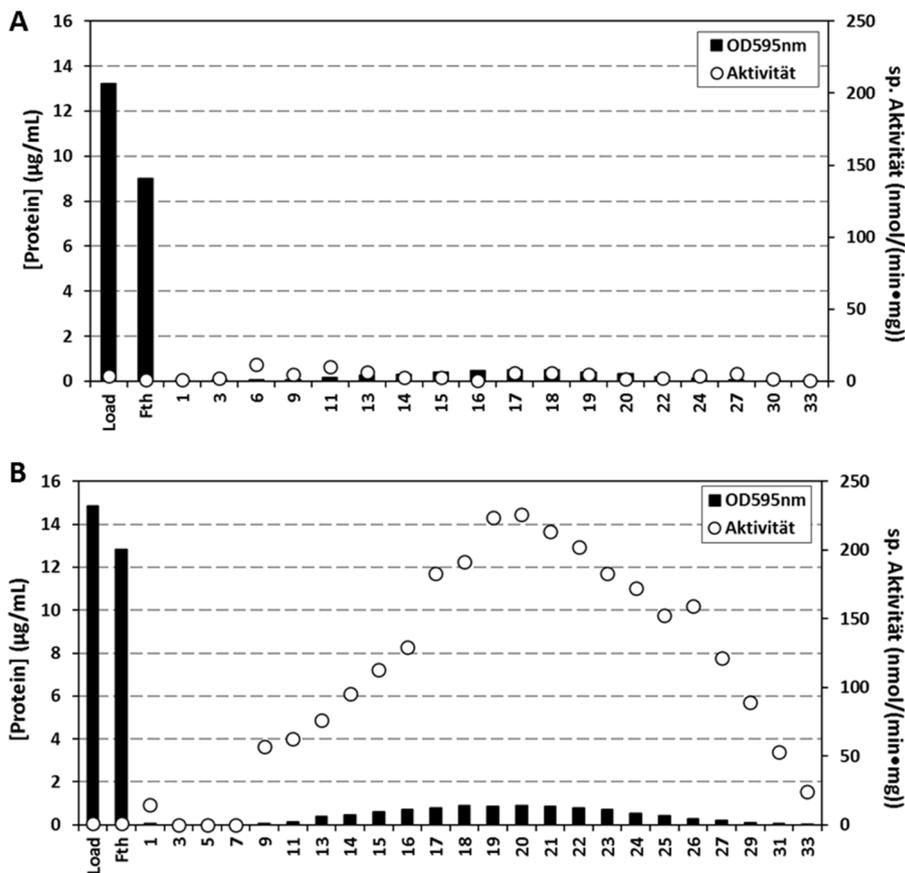


Abb. 3.14 Fraktionsprofile der Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Reinigung der ^{D_m}cN₂. Dargestellt sind die Proteinkonzentrationen (schwarze Balken) und die spezifischen Aktivitäten (Kreise) der getesteten Fraktionen. **A)** Die Ni-NTA-Chromatographie wurde mit Lysat eines nichttransformierten *E. coli*-Ansatzes durchgeführt. **B)** Die Ni-NTA-Chromatographie wurde mit *E. coli*-Lysat durchgeführt, welches rekombinantes His₆-SUMO-^{D_m}cN₂ enthält. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Die spezifische Aktivität wurde mit 5'-IMP als Substrat unter Standardreaktionsbedingungen mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungstest bestimmt. Fth, flow through.

3.3.3 Die ^{D_m}cN₂ ist ein Tetramer

Aufgrund der eher geringen Konzentration an präparierter ^{D_m}cN₂ war eine analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes nicht möglich. Um dennoch Aufschluss über den Oligomerisierungszustand zu erhalten, wurde eine Gelfiltration über Sephacryl 200 durchgeführt (s. 5.5.2.5). Die Fraktionen der Gelfiltration wurden durch eine SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung auf ihren Proteingehalt analysiert. Die ^{D_m}cN₂ wurde während der Konzentrierung teilweise leicht abgebaut, denn wie in Abb. 3.15 zu erkennen ist, waren deutlich zwei Proteinbanden im *load* vorhanden. Aus Kalbsthymus isolierte cN₂ wies ebenfalls nach

kurzer Zeit zwei Proteinbanden in einer SDS-PAGE-Analyse auf (59 und 54 kDa), die beide immunoreaktiv auf einen cN2-spezifischen Antikörper reagierten (Allegrini et al. 2004). Das 54 kDa-Protein war in diesen Studien voll aktiv und zeigte vergleichbares Verhalten in Gegenwart von Effektoren wie volllanges Protein. Beide Proteinspezies verhielten sich auch sehr ähnlich während der Gelfiltration, so eluierten beispielsweise beide in zwei Peaks. Im ersten Peak eluierte der Großteil des aufgetragenen Proteins mit einer molekularen Masse von ca. 565 kDa. Im zweiten Peak wurde deutlich weniger Protein eluiert mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa. Neben dem Proteingehalt wurde auch die 5'-Nukleotidaseaktivität der Fraktionen getestet (s. Abb. 3.15). Hierfür wurde der Umsatz von 5'-IMP mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstestes bestimmt. Nur die Fraktionen des zweiten Peaks bei 240 kDa wiesen eine deutliche 5'-IMP-Nukleotidaseaktivität auf, was darauf schließen lässt, dass es sich beim ersten Peak zwar um ein Oligomer der ^{Dm}cN2 handelte, dieses jedoch nicht aktiv zu sein scheint.

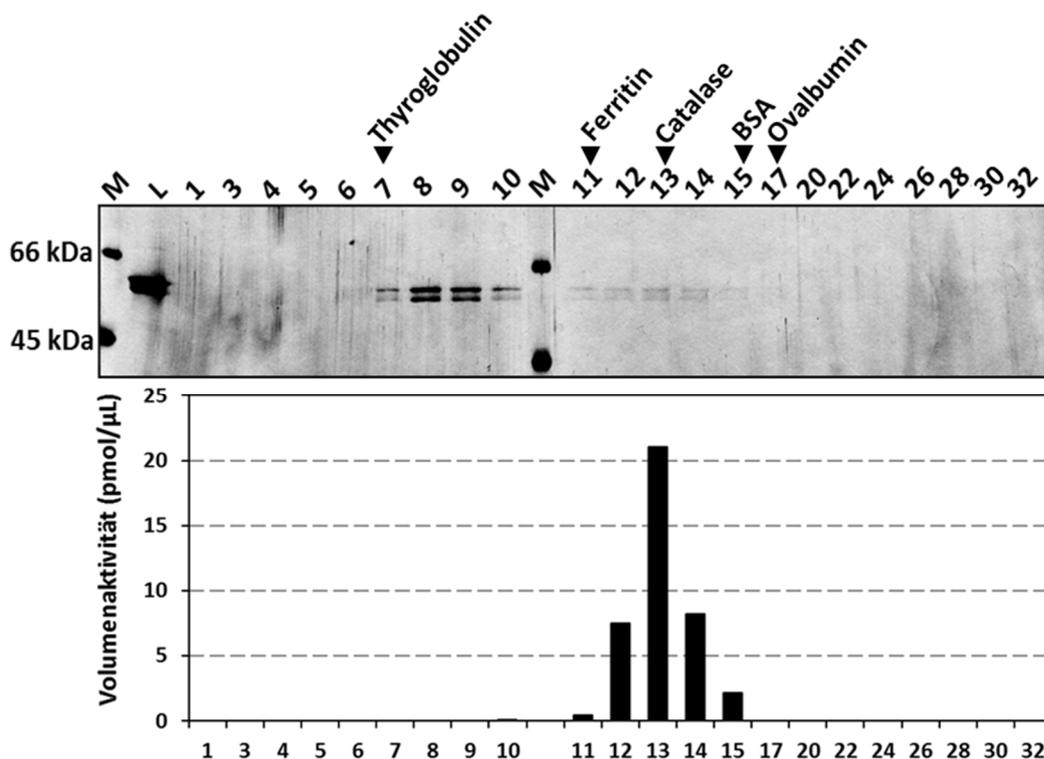


Abb. 3.15 Bestimmung des nativen Molekulargewichts der ^{Dm}cN2 über Gelfiltration. Die Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie wurden auf ihren Proteingehalt durch eine SDS-PAGE-Analyse analysiert (Gelbild oben) und auf ihre 5'-Nukleotidaseaktivität gegenüber 5'-IMP getestet (Aktivitätsprofil unten).

Mit dem detektierten Molekulargewicht von ca. 60 kDa in der SDS-PAGE-Analyse ist davon auszugehen, dass der zweite Peak tetrameres ^{Dm}cN2 beinhaltet. Dies deckt sich mit den Eigenschaften der humanen cN2, die als Tetramer kristallisiert wurde (s. 2.4.1, s. Abb. 2.8). Bei einer Gelfiltration von boviner cN2 wurde ebenfalls ein zusätzliches Oligomer mit einem Molekulargewicht um 720 kDa detektiert, welches keine 5'-Nukleotidaseaktivität aufwies (Pesi et al. 2010). Dieser Peak war jedoch nicht vorhanden, wenn die Expression bei deutlich niedrigeren Temperaturen stattfand. Vermutlich wurde bei höheren Temperaturen cN2 exprimiert, das zwar löslich, jedoch nicht korrekt gefaltet vorlag. Dieses hat sich dann zu höhermolekularen Komplexen zusammengelagert.

3.3.4 Enzymologische Charakterisierung der ^{Dm}cN2

Damit die kinetische Charakterisierung der ^{Dm}cN2 unter optimalen Reaktionsbedingungen stattfinden konnte, wurde zunächst die Aktivität der rekombinanten ^{Dm}cN2 mit 5'-IMP bestimmt. 5'-IMP ist das bevorzugte Substrat der humanen cN2 mit einem K_M -Wert von 0,2 mM und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $7 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Bretonnet et al. 2005).

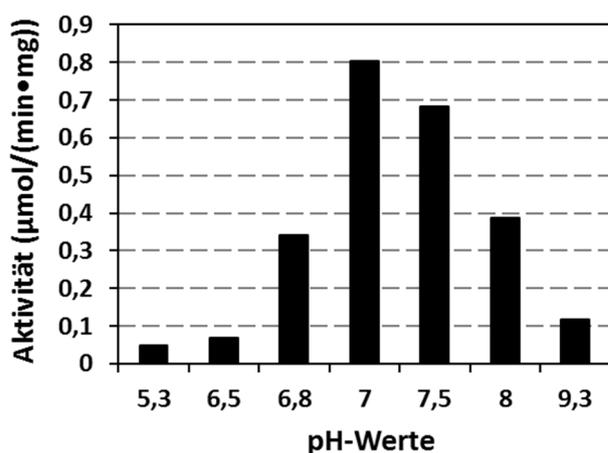


Abb. 3.16 Die Aktivität der ^{Dm}cN2 ist pH-abhängig. Die Aktivität wurde mit dem Substrat 5'-IMP getestet und die Freisetzung von Phosphat mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungsassay gemessen. Für den Aktivitätsassay wurden Puffer verschiedener pH-Werte verwendet.

Die höchste ^{Dm}cN2-Aktivität mit 5'-IMP als Substrat wurde bei pH 7,0 ermittelt (s. Abb. 3.16). Auch die Abhängigkeit der ^{Dm}cN2 vom Cofaktor Mg^{2+} wurde experimentell bestätigt. Eine Inkubation mit EDTA führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (s. Abb. 3.17.D). Durch anschließende Zugabe von Magnesiumacetat im Überschuss

wurde die Aktivität zu 53% wieder hergestellt. Des Weiteren wurde auch die Redoxempfindlichkeit der ^{Dm}cN2 getestet. Hierfür wurde das Enzym entweder mit DTT oder GSSG zehn Minuten vorinkubiert und dann dessen Aktivität mit 5'-IMP bestimmt. Es wurde eine leichte Stimulation der Aktivität mit DTT beobachtet. Die Inkubation mit GSSG hatte keinen negativen Effekt auf die 5'-Nukleotidaseaktivität der ^{Dm}cN2. Die Vermessung der ^{Dm}cN2 zur Bestimmung der katalytischen Parameter K_M und V_{max} wurde daher unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Es wurde außerdem untersucht, ob die Zugabe von ATP (1 mM) einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der ^{Dm}cN2 hat. In der Literatur wurde ATP als starker Aktivator der ^{Hs}cN2 beschrieben (Itoh 1993). Tatsächlich wurde auch das *D. melanogaster*-Enzym durch ATP aktiviert. Es wurde eine Steigerung des V_{max} -Wertes von Faktor 5 unter Substratsättigung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Es wurde jedoch auf eine Zugabe von ATP während der Bestimmung der enzymkinetischen Parameter verzichtet.

3.3.5 Die ^{Dm}cN2 weist hohe K_M -Werte für alle Substrate auf

Das Enzym wurde mit verschiedenen 5'-NMPs inkubiert und die zeitabhängige Dephosphorylierung mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstestes bestimmt, um die Substratspezifität der ^{Dm}cN2 zu testen. Die Dephosphorylierung der getesteten 5'-NMPs erfolgte linear über die Zeit und die eingesetzte Enzymkonzentration. Aus den Progesskurven wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt und diese gegen die verwendete Substratkonzentration aufgetragen. Unerwarteterweise spiegelten die erhaltenen v -S-Diagramme keinen Zusammenhang nach Michaelis-Menten wieder, sondern zeigten eine sigmoide Abhängigkeit (s. Abb. 3.17.A-C). Tatsächlich wurde dies auch für gereinigtes cN2 aus Rattenleber festgestellt, in späteren Analysen jedoch entweder durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen oder durch Zusatz von ATP umgangen (Itoh 1981; van den Berghe et al. 1977). Enzyme, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind und dadurch mehrere aktive Zentren besitzen, weisen häufig ein kooperatives Verhalten auf und sind allosterisch reguliert. Die Kooperativität solcher Enzyme äußert sich in einem sigmoiden Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit

und der Substratkonzentration. Da die $^{Dm}cN2$ nativ als Tetramer vorliegt und somit vier aktive Zentren aufweist, ist die kooperative Wechselwirkung der Untereinheiten eine mögliche Erklärung für die beobachtete Sigmoidität.

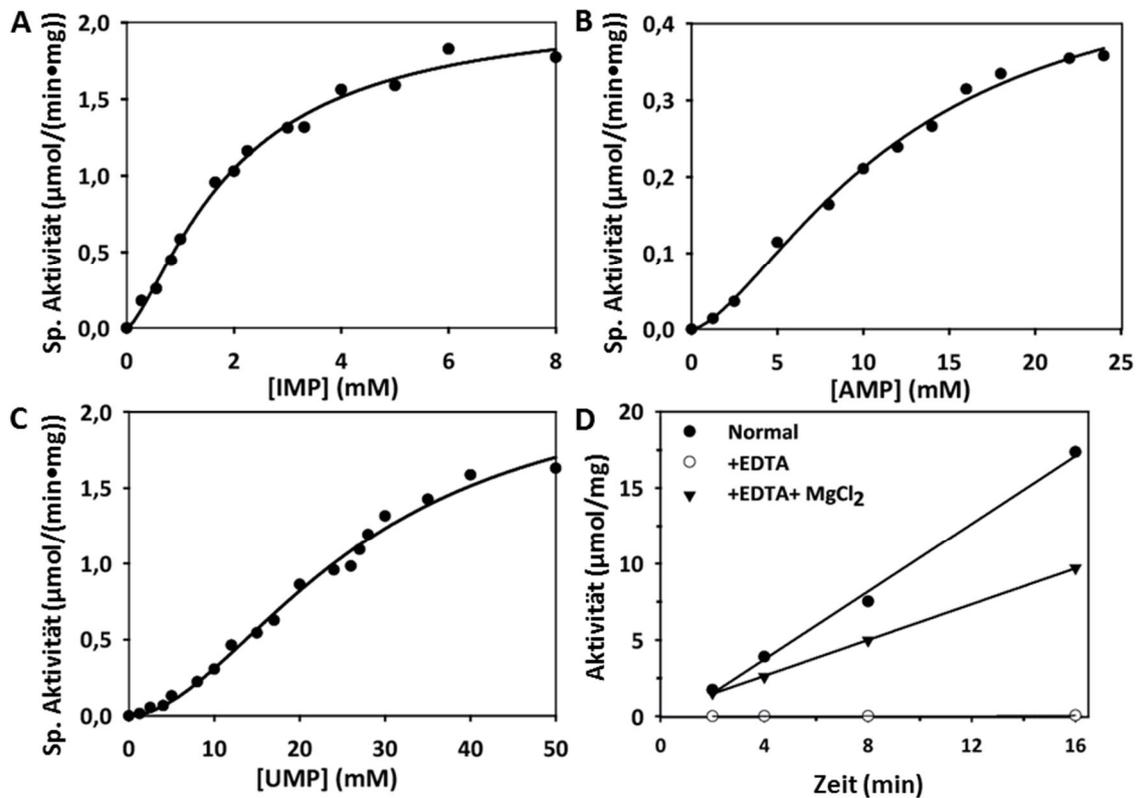


Abb. 3.17 Die enzymkinetische Charakterisierung der $^{Dm}cN2$ mit verschiedenen 5'-NMPs, sowie die Abhängigkeit des Enzyms vom Cofaktor Mg^{2+} . A-C) Dargestellt sind v-S-Charakteristiken von $^{Dm}cN2$ mit verschiedenen 5'-NMPs. D) Die 5'-Nukleotidaseaktivität der $^{Dm}cN2$ ist magnesiumabhängig. Die Freisetzung von Orthophosphat durch die $^{Dm}cN2$ wurde mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstest ermittelt. Im dargestellten Produkt-Zeit-Diagramm sind folgende Kinetiken mit jeweils 100 ng Enzym und 2 mM 5'-IMP erfasst: ●, Reaktionsmix mit 2,5 mM Magnesiumacetat; ○, Reaktionsmix mit $^{Dm}cN2$, das mit 10 mM EDTA 10 min vorinkubiert wurde; ▲, Reaktionsmix, wie ●, jedoch mit Zugabe von 12,5 mM Magnesiumacetat nach Vorinkubation.

Um dennoch numerische Aussagen zur Enzymkinetik treffen zu können, wurde für die Auswertung der v-S-Diagramme die Hill-Gleichung verwendet, ein nichtlineares Regressionsmodell, obwohl dieses einige Limitationen aufweist (Prinz 2010; Weiss 1997; Heck 1971). Die Hill-Gleichung ergibt sich durch die simple Annahme, dass eine Vielzahl an Substraten an einen Rezeptor binden kann, jedoch an verschiedene Bindestellen (Formel 4). Sie ist damit eine Erweiterung der Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 5):



$$v = \frac{V_{\max} * [S]^n}{K^n + [S]^n} \quad (\text{Formel 5})$$

mit v , als Reaktionsgeschwindigkeit, V_{\max} , als maximale Reaktionsgeschwindigkeit, n , als Hill-Koeffizient als ein Maß für die Kooperativität, $[S]$, als Konzentration an freiem Substrat und K als apparente Assoziationskonstante.

Diese Vereinfachung ist plausibel, solange nur ein Substrat mit einer Bindestelle (Rezeptor) interagiert. Da für die $^{\text{Hs}}\text{cN2}$ jedoch bereits gezeigt worden ist, dass pro aktivem Zentrum nur ein 5'-NMP gebunden werden kann, ist dieses Modell hinreichend für die Auswertung der erhaltenen Kurven. Die Ergebnisse wurden in Tab. 3.6 zusammengefasst. Die Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K) der $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ waren für 5'-IMP und 5'-GMP am höchsten. Diese Substrate wurden auch für andere cN2-Enzyme als die besten identifiziert, auch für die $^{\text{Hs}}\text{cN2}$ (s. 2.4.1). Die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ weist außerdem sehr viel höhere K -Werte für ihre Substrate auf als die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$. Die für 5'-IMP und 5'-GMP ermittelten K -Werte sind vergleichbar mit Daten die für andere cN2-Enzyme ermittelt worden sind (z. B. für 5'-IMP 0,2-1,4 mM und für 5'-GMP 0,7-1,6 mM; Bretonnet et al. 2005). Die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ war auch in der Lage Pyrimidinnukleotide umzusetzen, jedoch mit sehr niedrigen k_{cat}/K -Werten. Das schlechteste Substrat für die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ war jedoch 5'-AMP mit einem k_{cat}/K -Wert von ca. $50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Diese enzymkinetischen Parameter sind im physiologischen Kontext jedoch mit Vorbehalt zu betrachten, da die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ durch ATP aktiviert wird. Bei einer zellulären ATP-Konzentration von ca. 2 mM ist eine erhöhte maximale Geschwindigkeit der $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ sehr wahrscheinlich. Trotzdem bedeuten die hohen K -Werte bereits, dass vermutlich nur die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ im *D. melanogaster*-Embryo für eine signifikante Dephosphorylierung von 5'-AMP verantwortlich ist.

Die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ wurde auch mit m^7GMP inkubiert, jedoch konnten für dieses Substrat die enzymkinetischen Parameter K und V_{\max} nicht bestimmt werden. Mit einer

Endkonzentration an $m^7\text{GMP}$ von 5 mM und einer Enzymmenge von ca. 1 μg wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ erreicht. Der Assay konnte nicht mit höheren $m^7\text{GMP}$ -Konzentrationen durchgeführt werden, da das kommerziell erworbene $m^7\text{GMP}$ nur eine maximale Konzentration von 10 mM besaß. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten bis 5 mM $m^7\text{GMP}$ lassen jedoch vermuten, dass sich der K-Wert der $\text{D}^m\text{cN2}$ für $m^7\text{GMP}$ über 5 mM befindet. Damit trägt die $\text{D}^m\text{cN2}$ -Aktivität nicht zu einem signifikanten Umsatz an $m^7\text{GMP}$ im *D. melanogaster*-Embryo bei.

Tab. 3.6 Enzymkinetische Parameter der $\text{D}^m\text{cN2}$. N.d., nicht determiniert.

5'-NMP	K (mM)	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
IMP	2,0	2,1	2,44	1221
AMP	12,1	0,5	0,58	48
GMP	1,3	0,7	0,81	623
CMP	13,4	0,9	1,05	78
UMP	22,2	1,6	1,86	84
$m^7\text{GMP}$	n.d.	n.d.		

3.3.6 Die $\text{H}^s\text{cN2}$ ist 5'-GMP-spezifisch

Von den sieben bekannten zytosolischen 5'-Nukleotidasen im Menschen ist nur die $\text{H}^s\text{cN2}$ als 5'-IMP/5'-GMP-spezifisch beschrieben worden (s. 2.4.1). Da $m^7\text{GMP}$ eine modifizierte Variante des 5'-GMPs ist, sollte zur Kontrolle auch die $\text{H}^s\text{cN2}$ auf einen Umsatz von $m^7\text{GMP}$ getestet werden. Die cDNA der $\text{H}^s\text{cN2}$ wurde durch RT-PCR auf RNA aus U2OS-Zellen (humane Osteosarkoma-Zelllinie) amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert (s. 5.4.1-3). Das Protein wurde dann rekombinant in *E. coli* erzeugt (Buschmann 2010). Die Reinigung bis zur Homogenität erfolgte innerhalb der Promotionsarbeit und ergab vollständiges $\text{H}^s\text{cN2}$ mit einer Konzentration von $10,2 \mu\text{M}$ (s. 5.5.3). Die 5'-Nukleotidaseaktivität der präparierten $\text{H}^s\text{cN2}$ wurde mit 5'-GMP und $m^7\text{GMP}$ bestimmt und der Umsatz mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungstest untersucht (s. Abb. 3.18).

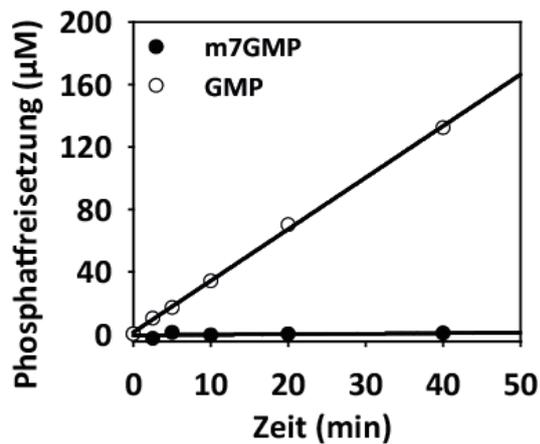


Abb. 3.18 Die ^{Hs}cN2 ist eine 5'-GMP-spezifische Nukleotidase. Es wurden 330 ng Enzym mit 3 mM Substrat bei Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und der Phosphatgehalt mit dem colorimetrischen Dephosphorylierungstest bestimmt. ●, m⁷GMP; ○, 5'-GMP.

Die 5'-IMP/5'-GMP-spezifische 5'-Nukleotidase ist bereits sehr gut charakterisiert worden, so dass auf eine erneute Bestimmung des K_M -Wertes für 5'-GMP verzichtet wurde (Bretonnet et al. 2005). Es wurde jedoch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unter Substratsättigung bestimmt und diese korrelierte sehr gut mit den in der Literatur angegebenen Werten ($6-30 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Mit dem Substrat m⁷GMP wurde eine minimale Dephosphorylierung über die Zeit beobachtet mit einer 350fach schlechteren Rate als für 5'-GMP. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der humanen cN2 tatsächlich um eine 5'-GMP-spezifische, nicht m⁷GMP-spezifische 5'-Nukleotidase handelt.

3.4 Kristallstrukturanalysen

Wie in den voran gegangenen Kapiteln gezeigt wurde, setzt die $^{Dm}cN3B$ neben den erwarteten Pyrimidinnukleotiden 5'-CMP und 5'-UMP auch das Purin-Nukleotid m^7GMP um. Tatsächlich waren auch die humanen Homologen der $^{Dm}cN3B$ in der Lage, m^7GMP zu dephosphorylieren, obwohl postuliert worden war, dass diese Enzyme Purinnukleotide nicht in ihrem aktiven Zentrum binden können (Grobosky et al. 2012). Um zu klären, wieso m^7GMP ein Substrat der $^{Dm}cN3B$ ist, wurde das Enzym in Gegenwart von 7-Methylguanosin bzw. Cytidin kristallisiert und dann deren Struktur durch Röntgenstrukturanalyse gelöst (Dr. Thomas Monecke, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Ficner, Georg-August-Universität Göttingen).

3.4.1 $^{Dm}cN3B$ -Kristallstruktur zur Untersuchung der Substraterkennung

Die $^{Dm}cN3B$ wurde in Gegenwart des Produktes 7-Methylguanosine und Mg^{2+} kristallisiert (Monecke et al. 2014; PDB-ID: 4NV0). Im Kristallisationsansatz befand sich zu dem eine Mischung aus $AlCl_3$ und NaF, die in Lösung AlF_3 bilden sollten, einem Übergangszustandsanalogon für Phosphoryltransfer-Reaktionen. Als Startmodell zur Lösung der erhaltenen Kristallstruktur wurde die murine cN3A (PDB-ID: 2G08) verwendet (Bitto et al. 2006). Die Struktur der $^{Dm}cN3B$ mit 7-Methylguanosin wurde durch molekulares *replacement* bis zu einer Auflösung von 1.65 Å gelöst (Monecke et al. 2014). In der erhaltenen Kristallstruktur wurden 298 von 319 Aminosäuren der $^{Dm}cN3B$ detektiert. Nur wenige Aminosäuren am N- und C-Terminus konnten keiner Elektronendichte zugeordnet werden, so dass ein durchgängiges Polypeptid von Aminosäure 13-311 konstruiert werden konnte. Im aktiven Zentrum wurden zusätzliche Elektronendichten detektiert, die zum einen einem oktahedral-koordinierten Magnesiumion, zum anderen einem Metallfluorid-Molekül entsprachen. Das Metallfluorid wurde unter Beachtung des vorliegenden pH-Wertes ($pH > 7$) als MgF_3^- identifiziert, nicht als AlF_3 , welches eher bei saureren Bedingungen vorliegt (Baxter et al. 2008). Außerdem wurde auch die Elektronendichte des 7-Methylguanosins detektiert.

3.4.1.1 Die Struktur der ^{Dm}cN3B, einer typischen zytosolischen 5'-Nukleotidase

Die Kristallstrukturanalyse zeigte deutlich, dass die ^{Dm}cN3B ein globuläres Enzym ist, das die typischen Merkmale einer zytosolischen 5'-Nukleotidase aufweist. So besitzt es die Rossmann-ähnliche Faltung der HAD-Superfamilie, sowie zwei Insertionen, die C1- und C2-*cap*-Struktur (s. Abb. 3.19).

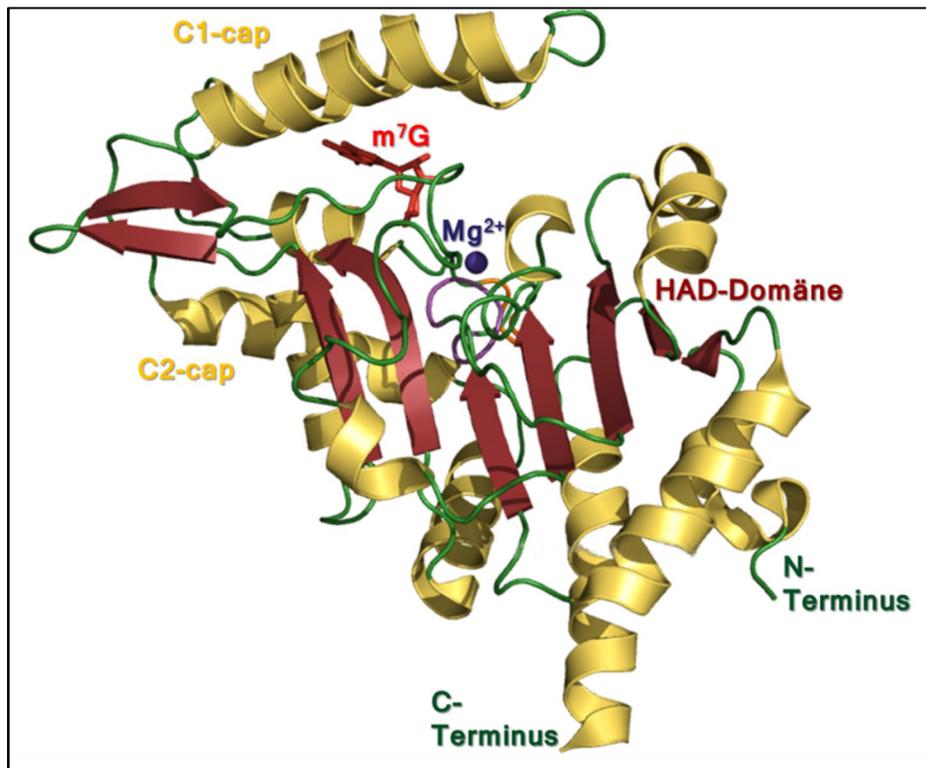


Abb. 3.19 Die Kristallstruktur der ^{Dm}cN3B mit 7-Methylguanosin. Erstellt aus dem PDB-Eintrag 4NV0 mit Pymol® im Cartoon-Stil. α-Helices in Gelb, β-Faltblattstränge in Dunkelrot und *loop*-Bereiche in Grün. Das 7-Methylguanosin ist als *stick*-Modell in Rot eingefärbt, das Magnesiumion in Violett als Kugelmodell. Das *squiggle*-Element wurde in Lila, das *flap*-Element in Orange eingefärbt.

Die Rossmann-ähnliche Faltung wird von einem β-Faltblatt dominiert, das aus sieben Strängen aufgebaut ist. Die Stränge sind über α-Helices miteinander verbunden. Das gesamte Faltblatt ist in sich verbogen, sodass der erste β-Strang fast rechtwinklig zum letzten β-Strang steht. Das dort lokalisierte aktive Zentrum der ^{Dm}cN3B wird durch die drei typischen Motive gebildet (s. Tab. 3.7).

Tab. 3.7 Die katalytischen Motive der ^{Dm}cN3B. Die rot hervorgehobenen Aminosäurereste sind direkt an der Katalyse beteiligt.

Motiv	Sequenz
I	⁵⁵ DFDYTI
II	¹⁶⁸ LVFS
III	²¹⁹ K(N) ₂₅ DSIGD

Die zwei *cap*-Strukturen, C1- und C2-*cap*, trennen das Enzyminnere vom umgebenden Wasser ab und formen eine hydrophobe Tasche, in deren Mitte das aktive Zentrum lokalisiert ist (s. Abb. 3.20). Im C1-*cap* ist auch das Substraterkennungsmotiv S lokalisiert, das die Substratspezifität der 5'-Nukleotidase vermittelt. Auch die zwei typischen kleinen Strukturelemente, das *squiggle* (Phenylalanin 56-Threonin 61)- und das *flap* (Threonin 65-Glycin 68)-Element wurden in der ^{Dm}cN3B-Struktur detektiert (s. Abb. 3.19).

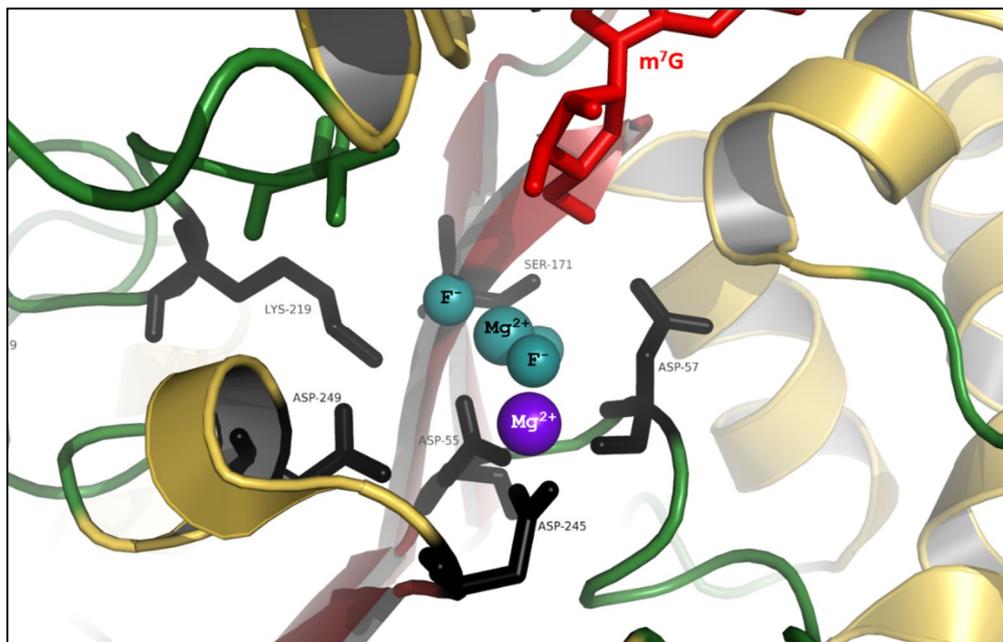


Abb. 3.20 Aktives Zentrum der ^{Dm}cN3B mit den katalytischen Motiven I, II und III. Erstellt aus dem PDB-Eintrag 4NVO mit Pymol®. Strukturfärbungen analog zu Abb. 3.19. Die wichtigsten Aminosäuren der katalytischen Motive I, II und III wurden in Schwarz als *stick*-Modell dargestellt. Zusätzlich wurde das detektierte MgF_3^- in Cyan als Kugelmodell abgebildet.

3.4.1.2 Bindung des 7-Methylguanოსins in einer hydrophoben Tasche

Das Enzym ^{Dm}cN3B wies überraschenderweise einen sehr niedrigen K_M -Wert für die methylierte Variante des 5'-GMPs auf, obwohl es ein Homologes der pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidasen ist (s. Ergebnisse 3.1.9). Diese Unstimmigkeit wurde durch die erhaltene Kristallstruktur erklärbar.

Das 7-Methylguanოსin-Molekül wird in der Kristallstruktur direkt zwischen dem Substraterkennungsmotiv S des C1-*caps* und der HAD-Domäne gebunden, wobei sowohl die Nukleobase, als auch der Ribose-Zucker erkannt und durch mehrere Seitenketten koordiniert werden. Insbesondere das Guaninringsystem ist von drei aromatischen Seitenketten (Phenylalanin 75, Tryptophan 120 und 121) umgeben, die eine Art dreiseitigen, hydrophoben Käfig aufbauen (s. Abb. 3.21).

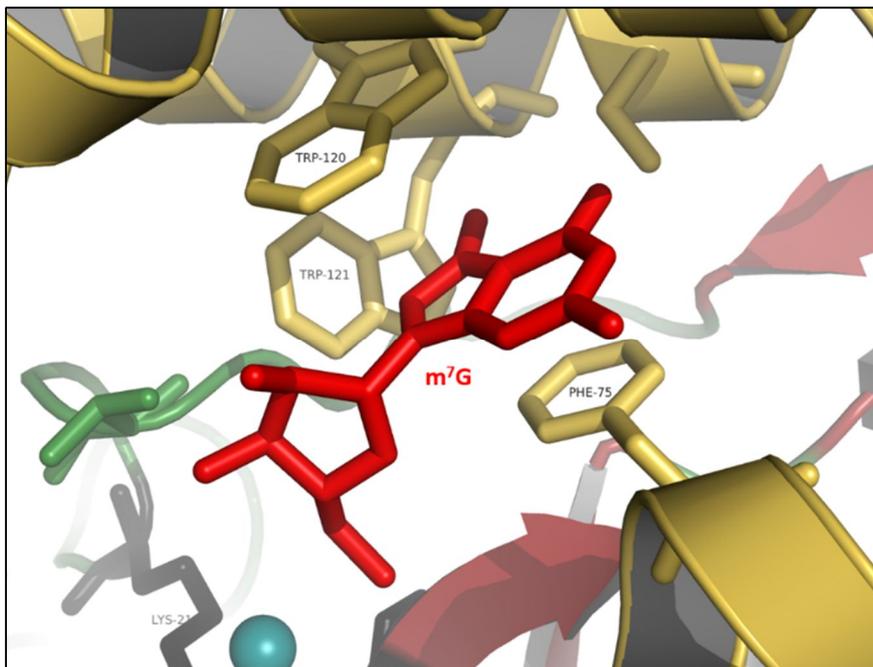


Abb. 3.21 Koordination des Guaninringsystems in einem hydrophoben Käfig. Erstellt aus dem PDB-Eintrag 4NV0 mit Pymol®. Strukturfarbungen analog zu Abb. 3.19. Die drei aromatischen Aminosäuren, die den hydrophoben Käfig bilden, wurden in Gelb als *stick*-Modell dargestellt.

Dadurch wird das Guaninringsystem zwischen dem Phenylring des Phenylalanins 75 und dem Indolring des Tryptophans 120 parallel gestapelt, so dass die Zentren der Ringe leicht voneinander verschoben vorliegen (*off-centered parallel displaced stacking*; McGaughey et al. 1998). Durch diese Stapelung können die π -Elektronen der

Ringstrukturen miteinander wechselwirken, auch als π - π -*stacking*-Interaktion bekannt. Die dritte, hydrophobe Aminosäure, Tryptophan 121, ist mit ihrem Indolring rechtwinklig zum methylierten Guaninring positioniert (*T-shaped stacking*, McGaughey et al. 1998) und komplettiert damit den dreiseitigen, hydrophoben Käfig.

Die Bindung des 7-Methylguanins wird zusätzlich durch die positive Ladung des Guaninrings verstärkt, die durch die Methylierung des Stickstoffatoms N7 verursacht wird und hauptsächlich in dessen Nähe lokalisiert ist (Ruszczynska et al. 2003). Dadurch entstehen Coulomb-Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Guaninring und den π -Elektronen der hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin 75 und Tryptophan 120. Dies verursacht vermutlich die beobachtete starke Diskriminierung zwischen methyliertem und nichtmethyliertem 5'-GMP. Ebenfalls unterstützend wirkt sich die Positionierung des Methylrestes des 7-Methylguanins aus. Er befindet sich in einer Aussparung, die von den drei oben genannten aromatischen Resten geformt wird, sowie vom Serin 124 und vom Phenylalanin 209. Auch mehrere Wasserstoffbrücken steuern zur Bindung des 7-Methylguanins bei. Hierbei sind sowohl direkte (Serin 124) als auch wasservermittelte (Serin 73, Phenylalanin 75, Asparagin 79 und Tryptophan 120) Wasserstoffbrücken von Bedeutung. Zusammenfassend ist die Spezifität der ^{Dm}cN3B für m⁷GMP durch die Addition vieler einzelner Bindungsenergien zu erklären.

3.4.1.3 ^{Dm}cN3 bindet Purine und Pyrimidine

Um zu klären, warum die ^{Dm}cN3B in der Lage ist, sowohl Purin-, als auch Pyrimidinnukleotide umzusetzen, wurde sie zusätzlich in Gegenwart von Cytidin kristallisiert und die Struktur des erhaltenen Kristalls bis auf 2.05 Å gelöst (Monecke et al. 2014; PDB-ID: 4NWI). Der ermittelte K_M -Wert der ^{Dm}cN3B für 5'-CMP war im Vergleich mit dem für m⁷GMP um den Faktor vier größer, der V_{max} -Wert für 5'-CMP war jedoch auch um Faktor zwei größer, so dass 5'-CMP ebenfalls ein gutes Substrat der ^{Dm}cN3B ist.

Die Bindung des Cytidins in der gelösten Kristallstruktur erfolgt in derselben Substratbindetasche, wie für 7-Methylguanosin beobachtet wurde (s. Abb. 3.22). Der

Pyrimidinring des Cytidins ist hierbei zwischen Phenylalanin 75 und Tryptophan 120 fast parallel gestapelt, während der Indolring des Tryptophans 121 orthogonal zum Ring in einer *edge-to-face* Position koordiniert vorliegt. Besonders auffällig sind die vergleichsweise wenigen Wasserstoffbrückenbindungen, die zu Cytidin ausgebildet werden. Nur wenige Wassermoleküle sind im aktiven Zentrum dieses Kristalls detektiert worden, so dass nur eine direkte Wasserstoffbrücke mit Serin 124 wahrscheinlich ist. Mutmaßlich liegt hierin die geringere katalytische Effizienz der ^{Dm}cN3B für 5'-CMP begründet.

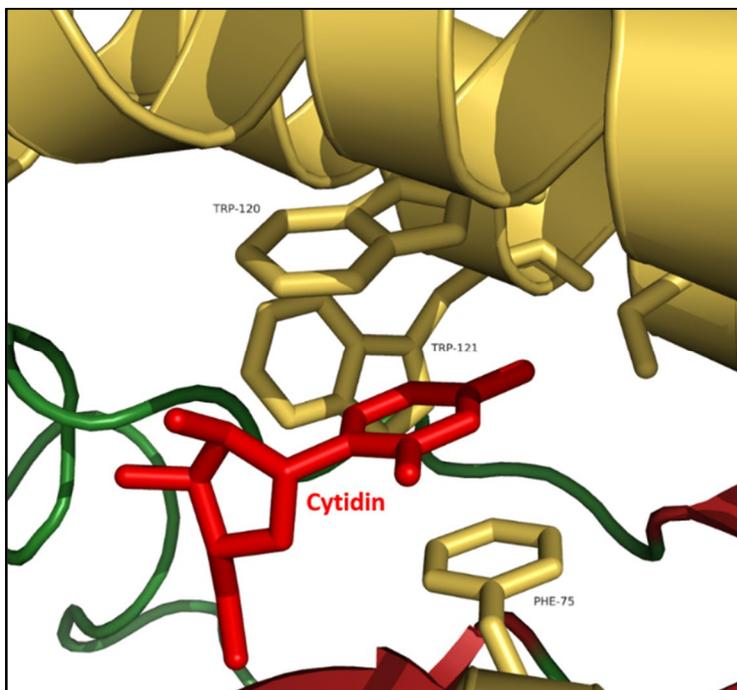


Abb. 3.22 Bindung des Cytidins in der gleichen Substratbindetasche wie 7-Methylguanodin. Erstellt aus dem PDB-Eintrag 4NWI mit Pymol®. Strukturfärbungen analog zu Abb. 3.21. Die drei aromatischen Aminosäuren, die den hydrophoben Käfig bilden, wurden in Gelb als *stick*-Modell dargestellt. Cytidin wurde ebenfalls als *stick*-Modell in Rot dargestellt.

3.4.2 ^{Dm}cN3B-Mutanten zur Klärung der Substratpräferenz

Ein erstaunliches Merkmal der ^{Dm}cN3B ist das breite Substratspektrum, denn obgleich 5'-AMP und 5'-GMP eher schlechte Substrate sind, wurden sie dennoch substantziell umgesetzt. Insbesondere im Vergleich mit den humanen 5'-Nukleotidasen sind die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der ^{Dm}cN3B für Purinnukleotide beachtenswert. In Vertebraten zeigten die untersuchten zytosolischen 5'-Nukleotidasen eine hohe Spezifität für entweder ein Nukleotid (cN1A: 5'-AMP) oder eine Nukleotidklasse (cN2: Purine und cN3A: Pyrimidine) (s. 2.1). Um zu analysieren, welche Aminosäurereste im

Substraterkennungsmotiv entscheidend für die breite Substratspezifität der ^{Dm}cN3B sind, wurden Mutationsstudien durchgeführt.

Ziel war die Generierung einer ^{Dm}cN3B-Variante, die die Substraterkennungstasche der ^{Hs}cN3A besitzt, um die Substratspezifitäten auszutauschen. Dies geschah unter der Annahme, dass ^{Hs}cN3A, als pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase, kaum nachweisbare Aktivität gegenüber Purinnukleotiden besitzt (s. 2.5.2). Durch Sequenzvergleiche und Vergleiche der Kristallstrukturen der ^{Dm}cN3B und der ^{Hs}cN3A wurden drei potentielle Aminosäurereste identifiziert, die wahrscheinlich die Substratspezifität modulieren: Phenylalanin 75, Glycin 76 und Tryptophan 121 (Positionen entsprechen der ^{Dm}cN3B-Proteinsequenz). Diese drei Aminosäuren sind in unmittelbarer Nähe um die Nukleobase lokalisiert und sind daher am ehesten an deren Koordination beteiligt (s. Abb. 3.21). Insbesondere das Tryptophan 121 schien ein entscheidendes Merkmal für cN3B-Enzyme zu sein. Im Sequenzvergleich der pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidasen in Wirbeltieren war dieses Tryptophan hochkonserviert (s. A.1.1.2). Die annotierten cN3A-Enzyme besaßen an dieser Position stattdessen ein Tyrosin. Der Phenylalaninrest 75 des *D. melanogaster*-Enzyms ist in den humanen Homologen durch ein Histidin (cN3A) bzw. ein Tyrosin (cN3B) ersetzt. Statt eines Glycins an Position 76 in der ^{Dm}cN3B besitzen die ^{Hs}cN3A und die ^{Hs}cN3B an dieser Stelle ein Asparagin, welches hochkonserviert zu sein scheint (s. A.1.1.2). Durch gerichtete Mutagenese auf die cDNA der ^{Dm}cN3B wurden die drei Aminosäurekandidaten wie folgt mutiert: F→H, G→N, W→Y (s. 5.4.5). Neben Einzelmutanten wurden auch Doppelmutanten und eine Tripelmutante generiert. Um die Nomenklatur der Varianten zu vereinfachen wurde ein vier Buchstabenkode verwendet, X₇₅X₇₆W₁₂₀X₁₂₁. Das Tryptophan 120 ist sowohl in der ^{Hs}cN3A als auch in der ^{Dm}cN3B konserviert und wurde in der Nomenklatur nur der Übersicht halber mitgeführt. Die Abkürzung für das ^{Dm}cN3B-Wildtypenzym ist somit FGWW, für das humane Enzym cN3A ist es HNWY. Die katalytischen Parameter der Mutanten wurden mit Hilfe des colorimetrischen Dephosphorylierungstestes ermittelt und in Tab. 3.8 zusammengefasst.

Tab. 3.8 Katalytische Parameter der ^{Dm}cN3B-Mutanten. Die Substrate 5'-CMP und m⁷GMP wurden mit den angegebenen Enzymvarianten inkubiert und die enzymkinetischen Parameter wie in 3.1.9 beschrieben ermittelt.

Substrat	Protein	K _M (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ •M ⁻¹)
5'-CMP	^{Dm} cN3B-WT: FGWW	48	12,7	264300
	FNWW	51	8	166300
	HGWW	490	8	16000
	FGWY	14	6	410200
	HGWY	93	3	32500
	FNWY	70	5	77800
	HNWY	315	9	28800
	^{Hs} cN3A-WT: HNWY	80	9	118600
m ⁷ GMP	^{Dm} cN3B-WT: FGWW	12	6,6	553600
	FNWW	2	1,1	545300
	HGWW	40	4,2	105800
	FGWY	<1	1,9	1874000
	HGWY	2	1,5	755400
	FNWY	8	0,3	37800
	HNWY	11	0,5	49500
	^{Hs} cN3A-WT: HNWY	15	0,5	21100

In früheren Studien wurde Asparagin 69 in ^{Hs}cN3A als mögliche Diskriminatorposition gegen Purine beschrieben (Grobosky et al. 2012). Diese Position entspricht dem Glycin 76 in der ^{Dm}cN3B. Der Austausch des Glycins gegen Asparagin in den Varianten FNWY und HNWY führte zwar zu einem verringerten k_{cat}-Wert für den Umsatz von m⁷GMP, jedoch blieb der niedrige K_M-Wert für m⁷GMP nahezu unbeeinflusst. In der Variante FNWW führte die Mutation des Glycins zum Asparagin sogar zu einem niedrigeren K_M-Wert für m⁷GMP. Im Vergleich dazu beeinflusste der Austausch zum Asparagin den Umsatz von 5'-CMP kaum. Es ist also davon auszugehen, dass ein Asparagin an Position 76 nicht maßgeblich für die Substratspezifität ist, zumindest nicht im *D. melanogaster*-Enzym. Die Mutationsanalysen wurden in dieser Hinsicht auch von *molecular docking*-Studien unterstützt, bei denen gezeigt wurde, dass durch eine Konformationsänderung

des Asparagins 69 auch genügend Raum für eine Bindung von m^7GMP in cN3A-Enzymen ist (Monecke et al. 2014). Auch das Doppeltryptophanmotiv ist nicht für eine Diskriminierung zwischen Purin und Pyrimidinbasen verantwortlich. Der Austausch zum Tyrosin, wie in FGWY, HGWY und FNWY, führte tendenziell zu einem Herabsinken des K_M -Wertes, jedoch auch des k_{cat} -Wertes für m^7GMP , während die Ergebnisse für 5'-CMP sehr unterschiedlich waren. Die Einzelmutation des Tryptophans 121 zum Tyrosin (FGWY) führte für 5'-CMP zu einem dreifach niedrigeren K_M -Wert und einem halbierten k_{cat} -Wert, so dass die katalytische Effizienz für 5'-CMP sogar besser als für das Wildtypenzym war. Doppelmutanten, bei denen Position 75 bzw. 76 zusätzlich mutiert wurden (HGWY und FNWY), wiesen jedoch erhöhte K_M -Werte und eine verringerte katalytische Effizienz für 5'-CMP auf. Das Phenylalanin 75 ist Teil des hydrophoben Käfigs und eine Mutation zu Histidin sollte die π - π -stacking-Wechselwirkungen mit den Nucleobasen und dem Tryptophan 120 erheblich verringern. Die Veränderung des Phenylalanins 75 zum Histidin (HGWW) führte sowohl bei 5'-CMP, als auch m^7GMP zu einem Anstieg des K_M -Wertes und zum einem Absinken von k_{cat} . Dadurch wurde besonders die katalytische Effizienz der Mutante für den Umsatz von 5'-CMP im Vergleich zum *D. melanogaster*-Wildtypenzym um einen Faktor von 16 verringert. Die Ausbildung der π - π -stacking-Wechselwirkungen ist also durchaus von Bedeutung für die Substraterkennung der cN3-Enzyme.

Durch die rekombinante Darstellung der Hs cN3A (s. 3.2.3) wurde deutlich, dass dieses Enzym durchaus Purinnucleotide umsetzen kann, insbesondere auch m^7GMP . Durch die Tripelmutation in der Dm cN3B wurde deren Substratspezifität jedoch der Hs cN3A ähnlicher. Es wurden nun sehr ähnliche k_{cat} -Werte für die Substrate 5'-CMP und m^7GMP ermittelt. Interessanterweise führte die Tripelmutation in der Dm cN3B jedoch zu einem sechsfach höheren K_M -Wert für 5'-CMP, während der K_M -Wert für m^7GMP kaum beeinflusst wurde. Generell wurde beobachtet, dass fast jede Veränderung der Substratbindetasche der Dm cN3B zu einem Verlust an katalytischer Effizienz führte und dass die Substraterkennung nicht durch wenige, einzelne Aminosäureseitenketten vermittelt wird.

3.5 Physiologische Bedeutung der zytosolischen 5'-Nukleotidasen in *D. melanogaster*

Die humanen, zytosolischen 5'-Nukleotidasen sind bereits umfangreich in ihrer physiologischen Bedeutung charakterisiert worden (s. 2.4). Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung zytosolischer 5'-Nukleotidasen in *D. melanogaster* wurden die Gene der ^{Dm}cN3B und der ^{Dm}cN2 mit Hilfe des piggyBac-Transposonsystems bzw. des CRISPR-Cas9-Systems deletiert (in Kooperation mit Dr. Thomas Rudolph und Matthias Walther, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Reuter, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg). Die so erzeugten *knockout*-Fliegen wurden phänotypisch und biochemisch charakterisiert.

3.5.1 Eine präzise Deletion des ^{Dm}cn3b-Gens

Für die Darstellung einer ^{Dm}cN3B-*knockout*-Fliege wurden Fliegenstämme der Exelixis-Stammbibliothek bestellt (*Havard medical school*; Bellen et al. 2004). Die Deletion eines chromosomalen Abschnitts bestimmter Größe und an einer präzise definierten Stelle wurde durch die Verwendung einer Rekombinase und Transposonelementen ermöglicht. Die Deletion sollte möglichst nur das ^{Dm}cn3b-Gen umfassen, daher wurden zwei Fliegenstämme ausgewählt, deren Transposonelemente direkt 5' und 3' vom ^{Dm}cn3b-Gen inseriert waren (s. Abb. 3.23.A). Die verwendeten Fliegenstämme enthielten unterschiedliche Transposonelemente der piggyBac-Klasse (Thibault et al. 2004): Fliegenstamm cN3B^{e01109} enthielt das piggyBac-RB-Element direkt vor dem 5'-Ende des ^{Dm}cn3b-Gens (45 Basenpaare vor dem Transkriptstart) und der Stamm cN3B^{f08086} das piggyBac-WH-Element, welches 19 Basenpaare vor dem 3'-Ende des ^{Dm}cn3b-Gens inseriert war (s. 5.2). Die beiden Elemente enthielten neben der eigentlichen Transposon-Sequenz außerdem eine FRT (*flippase recognition target*)-Sequenz und die Sequenz für das *mini-white*⁺-Markergen. Das Transposon piggyBac stammt aus der Insektenfamilie *Lepidoptera* und ist ein mobiles DNA-Element, das seine Position innerhalb der DNA verändern kann (Fraser et al. 1996). Die FRT-Sequenz ist eine spezifische DNA-Sequenz an die, die verwendete Rekombinase binden kann. Werden zwei FRT-beinhaltende Transposons in der richtigen Orientierung in *trans*

zusammengebracht, kann der chromosomale Bereich zwischen diesen beiden Elementen durch Rekombination deletiert werden (Thibault et al. 2004). Im vorliegenden Fall wurde die Rekombination von einer Hitze-induzierbaren Flippase katalysiert. Das *mini-white*⁺-Marker-gen ermöglichte hierbei die phänotypische Verfolgung (rote Augen-Phänotyp) der verwendeten Elemente während der durchzuführenden Kreuzungsschritte (Parks et al. 2004). Die Kreuzungen wurden von Dr. Thomas Rudolph durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die von ihm erzeugten homozygoten (^{Dm}cN3B^{-/-})-Taufliegen untersucht.

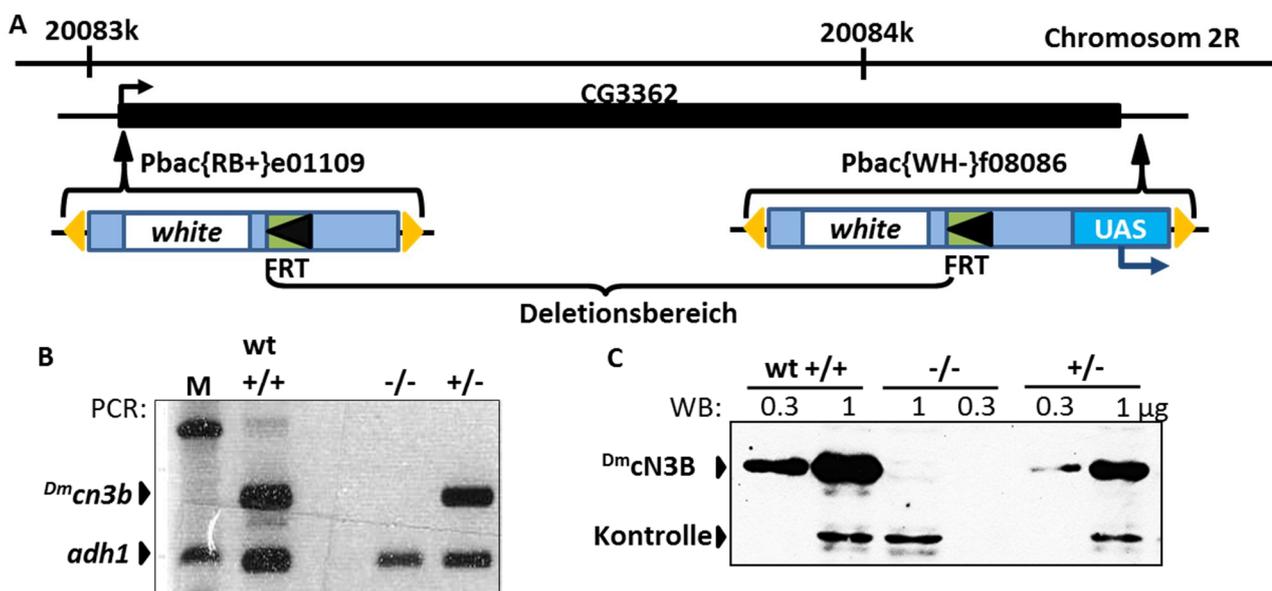


Abb. 3.23 Erzeugung einer ^{Dm}cN3B^{-/-}-Mutante. **A)** Schematische Darstellung der verwendeten Transposonelemente und deren Position im Chromosom 2R. **B)** Überprüfung der Deletion mittels PCR auf genomische DNA adulter Wildtyp-Fliegen (+/+), heterozygoter (+/-) und homozygoter (-/-) Deletionsfliegen. Die PCR wurde mit ^{Dm}cN3b-spezifischen Oligodesoxynukleotiden auf genomische DNA durchgeführt. Als Kontrolle wurden in dieselben Reaktionsansätze Oligodesoxynukleotide für die Amplifikation des *adh1*-Gens hinzugefügt. Das *adh1*-Gen ist ebenfalls auf 2R lokalisiert. **C)** Überprüfung der Deletion auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse. Die Proteine adulter Wildtypfliegen, sowie adulter ^{Dm}cN3B^{+/-}- und ^{Dm}cN3B^{-/-}-Fliegen wurden extrahiert und durch eine SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und anschließend über das Westernblot-Verfahren und Immunfärbung mit dem α-^{Dm}cN3B-Antikörper analysiert.

Der Erfolg der Deletion wurde zunächst auf DNA-Ebene durch PCR nachgewiesen. Es wurde eine PCR direkt auf das ^{Dm}cN3b-Gen durchgeführt, sowie auf DNA-Sequenzen, die durch die Rekombination von den piggyBac-Elementen übrig geblieben waren (s. Abb.3.23.B; Daten nicht gezeigt). Sowohl in Wildtypfliegen als auch Fliegen, die

heterozygot für die $Dm\text{cn}3b$ -Deletion ($Dm\text{cN}3B^{+/-}$) waren, wurden PCR-Produkte spezifisch für $Dm\text{cn}3b$ detektiert. Für homozygote Deletionsfliegen ($Dm\text{cN}3B^{-/-}$) wurde kein PCR-Produkt für $Dm\text{cn}3b$ erhalten. Die Deletion des $Dm\text{cn}3b$ -Gens war somit erfolgreich. Die Deletion wurde außerdem durch das Westernblot-Verfahren auf Proteinebene bestätigt (s. Abb. 3.23.C). Nach Entwicklung des Westernblots wurde ein spezifisches Antikörpersignal für $Dm\text{cN}3B$ in Wildtypfliegen sowie in der heterozygoten Mutante detektiert. In der homozygoten Variante wurde kein $Dm\text{cN}3B$ detektiert.

3.5.2 $Dm\text{cN}3B^{-/-}$ -Fliegen zeigen eine Entwicklungsstörung

Die durch die Deletion des $Dm\text{cn}3b$ -Gens erzeugten Mutanten waren lebensfähig und fertil. Sowohl Männchen als auch Weibchen schlüpften mit den erwarteten Wahrscheinlichkeiten nach Mendel (49:51 bei 567 Individuen). Jedoch wurde beobachtet, dass die Entwicklungszeit vom Embryo bis zum adulten Tier bei den homozygoten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um ca. einen Tag verzögert war (s. Abb. 3.24, s. 5.7.3).

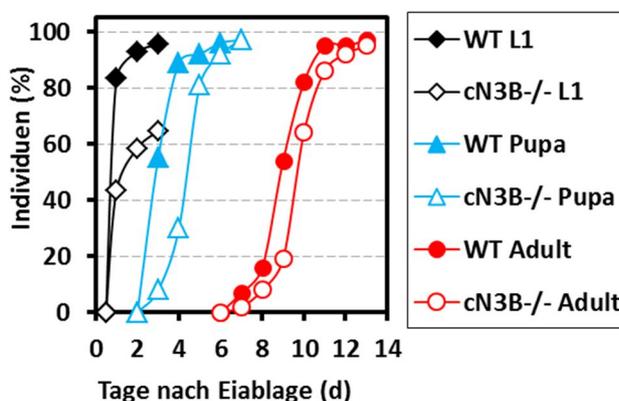


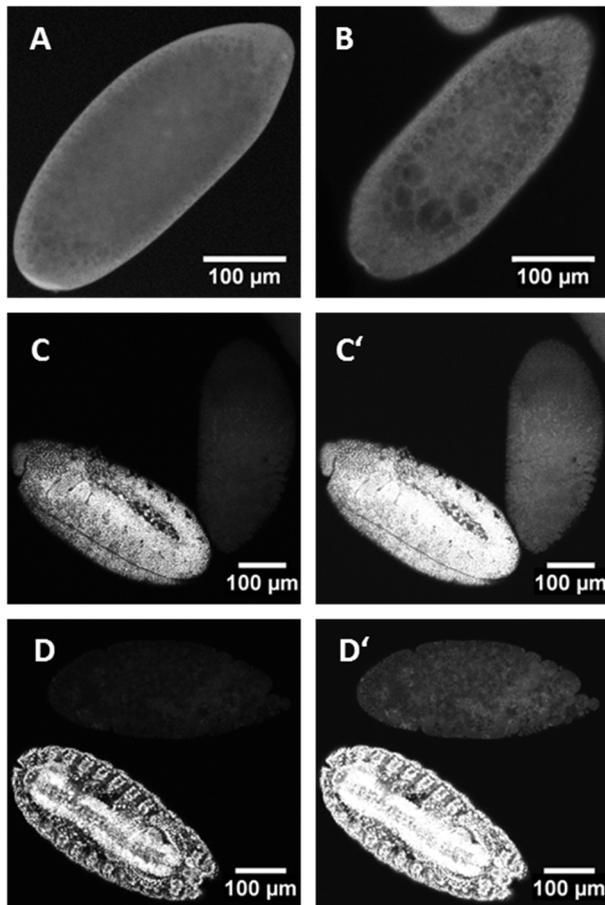
Abb. 3.24 Entwicklungsprofil der $Dm\text{cN}3B^{-/-}$ -Fliegen im Vergleich mit einem Wildtypstamm. Für die Erfassung der Schlupfrate zu L1 wurden für den Wildtyp 405 Individuen ausgezählt, für die Mutante 556. Für die Entwicklungsübergänge von Larve zur Puppe und von Puppe zu adulten Tieren wurden dreimal je 50 Larven (L1) in Kultivierungsröhrchen überführt und der Entwicklungsfortschritt zu den angegebenen Tagen überprüft.

Zu Beginn der *D. melanogaster*-Embryogenese fusionieren der mütterliche und väterliche Vorkern miteinander und es kommt zu einer Reihe von sehr schnellen Kernteilungen, mit einer Teilung alle 10 bis 25 min (Tram et al. 2001; Foe und Alberts 1983). Die ersten drei Kernteilungen finden im anterioren Bereich des Embryos statt und die entstandenen Kerne verbleiben in einem *cluster* (s. Abb. 3.25.A, Sullivan et al. 2000). Diese Kernteilungen und die darauffolgenden 10 Teilungen erfolgen dabei ohne

Zellteilung. Ab der vierten Teilung sammeln sich die entstandenen Kerne zunächst im Inneren des Embryos. Der Embryo befindet sich nun in der Preblastodermphase (Sullivan und Theurkauf 1995). Eine zygotische Transkription findet während dieser Zeit bis auf wenige Ausnahmen nicht statt (Laver et al. 2015; Harrison und Eisen 2015). Die für diese Phase benötigten Transkripte wurden zuvor während der Oogenese in die Oozyte transportiert, und werden daher als maternale Transkripte bezeichnet, da sie von der Mutter produziert wurden. Ab Zyklus 10 wandert ein Großteil der Kerne an die Peripherie des Embryos (synzytiale Blastodermphase, Sullivan und Theurkauf 1995). Ab Zyklus 14 werden diese Kerne von Zellmembranen umgeben. Diese Phase wird daher auch als zelluläre Blastodermphase bezeichnet. Anschließend erfolgen die Gastrulation und die Segmentierung des Embryos.

Wildtypembryonen entwickeln sich innerhalb von 24 h nach Eiablage zu Larven des Larvenstadiums 1 (L1). Im Gegensatz dazu entwickelten sich nur $46\pm 3\%$ der $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen nach 24 h zu L1-Larven (s. 5.7.3). Untypischerweise entwickelten sich nach weiteren 48 h noch einige Embryonen zu L1-Larven, sodass sich insgesamt $63\pm 4\%$ der abgelegten Embryonen zum L1-Stadium entwickelten. Die Embryonen, die nicht das L1-Larven Stadium erreichten blieben auf den Ablageplatten liegen und wurden als tote Embryonen gezählt. Die Individuen, die das L1-Stadium erreichten, entwickelten sich normal weiter zu adulten Tieren mit einer normalen Abbrecherquote von 3-5%. Die $D^m cN3B^{-/-}$ -Larven, die sich normal wie Wildtyp entwickelten, zeigten dabei keine erhöhte Sensitivität gegenüber Umweltfaktoren wie Hitze (Anzucht bei 37°C anstatt 25°C) und UV-Licht, d.h. zeigten keine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zum Wildtyp. Für die UV-Lichtbelastung wurden L2-Larven der Mutante und des Wildtyps verschiedenen Dosen von UV-Licht ausgesetzt (s. 5.7.8). Die $D^m cN3B^{-/-}$ -Larven zeigten jedoch die gleiche dosisabhängige Sterblichkeit wie Larven des Wildtyps (Sterberate Wildtyp-Larven L2 56% vs. $D^m cN3B^{-/-}$ -Larven L2 52% bei einer UV-Belastung von $300 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Eine Färbung der $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen mit DAPI zeigte, dass tatsächlich 50,8% ($n = 283$) in den ersten 20 h der Embryogenese eine verzögerte Entwicklung im Vergleich mit Wildtypembryonen des gleichen Alters aufwiesen (s. Abb. 3.25.C-D).



E

Embryo (h)	Total	Abnormal	Kein DAPI
6-8	74	40	11
10-12	97	50	18
14-16	75	36	15
18-20	37	18	11

Abb. 3.25 Wildtypembryonen und $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen mit DAPI eingefärbt. **A)** Wildtypembryo im Zyklus 3, der Vorkerncluster im anterioren Bereich (rechts oben) des Embryos ist noch deutlich zu erkennen, jedoch befinden sich auch schon einige Kerne im Embryoinneren. **B)** $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryo in einer frühen Phase der Embryogenese (Ablagezeitraum 0-2 h). In diesem Embryo wurde kein Kernmaterial ausgemacht. Zu erkennen sind jedoch große runde Bereiche, die kein DAPI-Hintergrundsignal aufweisen (*cellular clearings*). **C und C')** $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen 6 bis 8 Stunden nach Embryoablage mit unterschiedlich starken Helligkeits- und Kontrasteinstellungen. Alle Embryonen sollten sich mindestens bereits in der Gastrulationsphase befinden (Embryo links unten). Dennoch wurden hier Embryonen gefunden, die keine DAPI-Färbung aufwiesen. **D und D')** $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen 10 bis 14 Stunden nach Embryoablage mit unterschiedlich starken Helligkeits- und Kontrasteinstellungen. Auch hier wurden Embryonen gefunden, die sich weit hinter der normalen Entwicklung befanden und bereits eine apoptotische Morphologie aufwiesen (zelluläre Abschnürungen). **E)** Tabelle zur visuellen Auszählung fixierter und mit DAPI-angefärbter $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen. Das Entwicklungsalter sowie die Gesamtanzahl der Embryonen sind in den ersten zwei Spalten erfasst. Die dritte Spalte enthält die Anzahl an Embryonen, die sich nicht im selben Entwicklungsstadium wie Wildtyp befanden. In der vierten Spalte sind die abnormalen Embryonen erfasst, die kein DAPI-Signal aufwiesen.

In diesen $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen wurden keine bzw. eine viel zu geringe Anzahl an Kernen detektiert. Besonders in den frühen Phasen der Embryogenese (0 bis 6 Stunden) wurden in diesen $Dm cN3B^{-/-}$ -Embryonen zwar noch Kerne detektiert, jedoch lag hier bereits das DNA-Material oft nicht globulär als Kern organisiert vor. Stattdessen wurden kleine vereinzelte DNA-Fragmente ausgemacht, die einen Abbau der DNA vermuten lassen (s. Abb. 3.26.C). In späteren Phasen der Embryogenese (14-16 h) wies der Großteil der entwicklungsverzögerten Embryonen keine durch DAPI-nachweisbaren Kerne mehr auf (s. Abb. 3.25.E). In den morphologisch auffälligen

Embryonen wurden außerdem große, abnormale Bereiche beobachtet, die kein DAPI-Hintergrundsignal aufwiesen (s. Abb. 3.25.B). In der Literatur wurden solche Bereiche, als *cellular clearings* beschrieben (Ali-Murthy et al. 2013). Die anderen $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen entwickelten sich vergleichbar wie Wildtypembryonen und wiesen auch normale Kernstrukturen auf (s. Abb. 3.26.A und B).

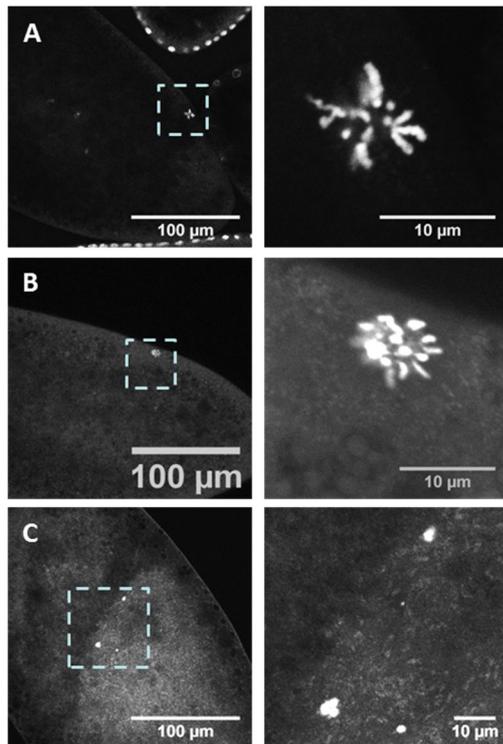


Abb. 3.26 Wildtypembryonen und Embryonen der $D^m cN3B^{-/-}$ -Mutante in den frühen Phasen der Embryogenese (Ablagezeitraum 0-2 h) mit DAPI eingefärbt. A) Aufnahme eines Wildtypembryos, der sich im mitotischen Zyklus 4 befindet. Noch deutlich zu erkennen ist der sphärisch angeordnete Kerncluster der ersten mitotischen Teilungen (rechts). Einige Kerne sind jedoch bereits ins Embryoinnere gewandert (links). **B)** Aufnahme eines Embryos der $D^m cN3B^{-/-}$ -Mutante, der sich vermutlich im Zyklus 2 oder 3 befindet. Dieser Embryo ist morphologisch unauffällig im Vergleich zu Wildtypembryonen. **C)** Aufnahme eines Embryos der $D^m cN3B^{-/-}$ -Mutante. Ein Zyklus lässt sich hier nicht zu ordnen, da die Kerne nicht in einem eindeutigen Cluster vorliegen. Es wurde außerdem DNA-Material detektiert, welches nicht die erwartete Größe eines normalen Kerns aufweist.

Wenn $D^m cN3B^{-/-}$ -Jungfrauen mit $D^m cN3B^{-/-}$ -Männchen verkreuzt wurden, produzierte jedes dieser Weibchen in Einzelablagen Embryonen, die sich nicht zu Larven weiter entwickelten (Dr. T. Rudolph, persönliche Mitteilung). Wurden $D^m cN3B^{-/-}$ -Jungfrauen mit Wildtypmännchen verkreuzt, legten auch hier alle Weibchen defekte Embryonen ab, obwohl die $D^m cN3B$ -Deletion in diesen abgelegten Embryonen nur noch heterozygot vorlag. Wurden im Vergleich dazu männliche $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegen mit Wildtypjungfrauen verkreuzt, wies die nächste Generation keine embryonalen Defekte auf. Alle abgelegten Embryonen entwickelten sich wie Wildtyp zu L1-Larven mit der erwarteten Abbrecherquote von 3-5%. Es handelt sich also bei den beobachteten Defekten um einen maternal-verursachten Entwicklungsdefekt.

Bei einer Kreuzung von zehn Männchen mit 25 Weibchen (Jungfrauen) wurde die Anzahl der Nachkommen bestimmt. Wurden bei der Kreuzung Wildtyp-Fliegen eingesetzt, wurden 443 Nachkommen gezählt (s. Abb. 3.27). Bei der Kreuzung von $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegen wurden unter den gleichen Bedingungen nur 181 Individuen gezählt, also 59% weniger als bei der Wildtyp-Fliegenkreuzung.

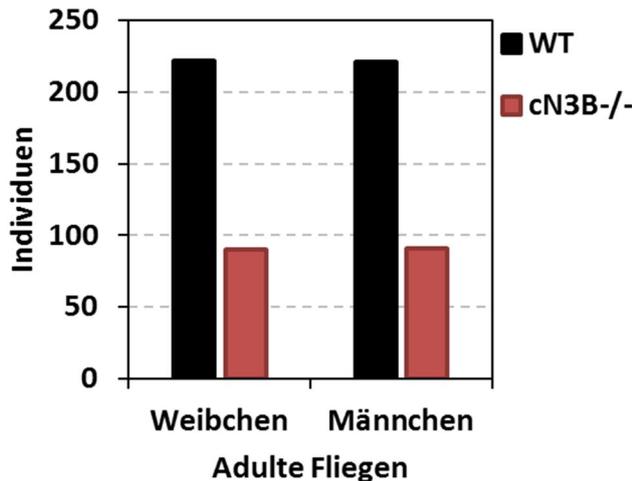


Abb. 3.27 Bestimmung der Anzahl der Nachkommenschaft. $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegen erzeugten dabei ca. 60% weniger Nachkommen als Wildtypfliegen unter den gleichen Bedingungen. Zehn Männchen wurden mit 25 Jungfrau-Weibchen in einem Kultivierungsröhrchen für 48 h zusammen gebracht. Nach ca. zehn Tagen schlüpften die ersten adulten Fliegen der F1-Generation. Diese wurden aus dem Röhrchen entfernt und am nächsten Tage wieder die Anzahl geschlüpfter Fliegen bestimmt. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis alle Nachkommen geschlüpft waren. Schwarz, für die Kreuzung wurden Wildtypfliegen verwendet; Rot, für die Kreuzung wurden $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegen verwendet.

Hinsichtlich dieses Befundes wurden auch die Ovarien von isogenen Wildtypweibchen und $D^m cN3B^{-/-}$ -Weibchen präpariert. Jedes *D. melanogaster*-Weibchen besitzt zwei Ovarien, die beständig Eier produzieren (Sullivan et al. 2000). Jedes Ovarium besteht aus einem Bündel von 15-20 Ovariolen, in denen die Oogenese in sogenannten Eikammern von statten geht. Jede Eikammer besteht aus 16 Keimzellen, nur eine davon entwickelt sich im Laufe der Oogenese zur Eizelle (Jenkins et al. 2013). Es wurden zwischen dem Wildtyp und der Mutante keine Unterschiede in der Größe der Ovarien, in der Anfärbbarkeit der Eikammern mit DAPI, noch in der Zusammensetzung der Eikammern an sich festgestellt (s. Abb. 3.28, s. 5.7.6). Demnach ist der beobachtete Effekt nicht defekten Ovariolen zuzuordnen. Dennoch ist die geringe Anzahl an Nachkommen bei der $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegenkreuzung nicht allein durch den beobachteten Phänotyp der Embryonen zu erklären. Vermutlich hängt die niedrige Nachkommenschaft auch mit der Anzahl abgelegter Embryonen zusammen.

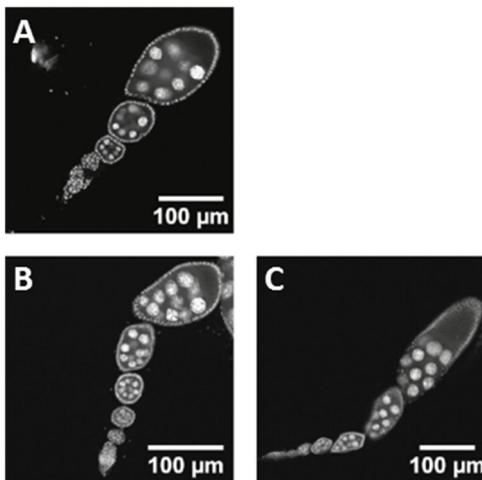


Abb. 3.28 Ovariolen von Wildtyp-Weibchen (A) und $D^m cN3B^{-/-}$ -Weibchen (B und C) mit DAPI eingefärbt. In den Eikammern wurden die sogenannten *nurse*-Zellen deutlich angefärbt, da sie einen besonders hohen Nukleinsäuregehalt aufweisen. Die Eizelle hingegen, die besonders deutlich in der letzten Eikammer der Ovariole am posterioren Pol zu erkennen ist, wurde kaum von DAPI angefärbt.

3.5.3 m^7GMP wird in $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryoextrakt nicht dephosphoryliert

Aus $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen wurde Extrakt präpariert, um zu untersuchen, ob die Deletion der $D^m cN3B$ tatsächlich Auswirkungen auf den im Wildtypembryoextrakt beobachteten Umsatz von m^7GMP hat. Hierfür wurden 0,5-2,5 h alte Embryonen von Wildtypfliegen und den $D^m cN3B^{-/-}$ -Fliegen gesammelt und nach dem Protokoll von Jeske und Wahle 2008 zu Extrakt verarbeitet (Jeske und Wahle 2008, s. 5.7.4). Beide Extrakte (WT und $D^m cN3B^{-/-}$) wurden mit ^{32}P -markiertem m^7GMP versetzt, und die 5'-Nukleotidaseaktivität untersucht (s. Abb. 3.29, s. 5.6.1 und 5.6.3).

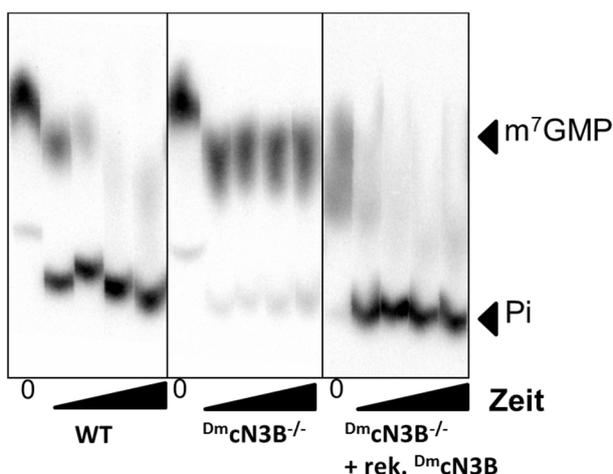


Abb. 3.29 Der Abbau von m^7GMP in Extrakten von Wildtypembryonen und $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen. Die Extrakte wurden unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit ^{32}P -radioaktiv markiertem m^7GMP inkubiert und aus den Ansätzen nach bestimmten Zeitpunkten (0; 2,5; 5; 10; 20 min) Proben entnommen. Die Proben wurden zum Stoppen der 5'-Nukleotidasereaktion sofort mit EDTA vermengt und zum Analysieren auf eine PEI-Celluloseplatte pipettiert. Die Produkte wurden anschließend über eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Platten wurden getrocknet und die Verteilung der Radioaktivität durch die Verwendung von *phosphor storage image screens* sichtbar gemacht.

Im Wildtypextrakt wurde wie erwartet eine schnelle Dephosphorylierung des ^{32}P - m^7GMPs über die Zeit beobachtet (nach 2,5 Minuten zu 80%). Im $\text{Dm}^{\text{cN3B}}^{-/-}$ -Extrakt hingegen wurde kaum ^{32}P -Phosphat über die gesamte Reaktionszeit freigesetzt (nach 20 Minuten 6%). Wurde diesem Extrakt jedoch rekombinantes Dm^{cN3B} beigegeben, wurde wieder ein vollständiger Umsatz des eingesetzten m^7GMPs innerhalb weniger Minuten erreicht. Es wurde geschlussfolgert, dass tatsächlich nur die Dm^{cN3B} im *Drosophila melanogaster*-Embryo für den Umsatz von m^7GMP verantwortlich ist.

3.5.4 Kein Einbau von m^7G -Nukleotiden in ribosomale RNA

Da im Extrakt von $\text{Dm}^{\text{cN3B}}^{-/-}$ -Embryonen kein deutlicher Umsatz von m^7GMP nachweisbar war, stellte sich die Frage, was mit dem durch den mRNA-Abbau freigesetzten m^7GMP passiert. m^7GMP kann nicht zum Aufbau der 5'-cap-Struktur der mRNA wiederverwertet werden (Shuman 2001). Da das m^7GMP durch die Deletion von Dm^{cN3B} offensichtlich auch nicht mehr zu 7-Methylguanosin abgebaut werden kann, müsste sich das m^7GMP im *D. melanogaster*-Embryo akkumulieren. *D. melanogaster*-Embryonen sind von einer fünfschichtigen, undurchlässigen Hülle umgeben (Margaritis et al. 1980). Besonders die Anwesenheit einer wächsernen Schicht verhindert dabei den Stoffaustausch mit der Umgebung. Die in der Einleitung beschriebenen Mechanismen des Nukleotidrecyclings wären eine vorstellbare Möglichkeit mit dem akkumulierenden m^7GMP umzugehen. Als m^7GTP wäre ein Einbau in Nukleinsäuren durch RNA-Polymerasen vorstellbar, da insbesondere auch für RNA-Polymerasen bereits gezeigt worden ist, dass sie m^7GTP als Substrat verwenden können (Hendler et al. 1970).

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ribosomale RNA aus $\text{Dm}^{\text{cN3B}}^{-/-}$ -Embryonen präpariert und auf Einbau von m^7G durch quantitative HPLC-MS-Analyse überprüft (in Kooperation mit Dr. Christian Ihling, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrea Sinz, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg). Hierfür wurden Ribosomen aus Embryoextrakten (10-12 h alte Embryonen) von Wildtypembryonen und $\text{Dm}^{\text{cN3B}}^{-/-}$ -Embryonen durch Ultrazentrifugation präpariert und mit EDTA-haltigem Puffer resuspendiert (s. 5.6.6-7). Diese Herangehensweise sollte den Eintrag von natürlich vorkommenden

m^7G -Nukleotiden durch mRNAs und tRNAs minimieren. Das Resuspendieren in EDTA-haltigem Puffer sorgte für eine vollständige Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten, sodass auch hier keine tRNAs mehr fest gehalten wurden. Anschließend wurden die ribosomalen Untereinheiten durch Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt und der Gradient fraktioniert (s. Abb. 3.30.A). Das UV-Profil der Fraktionierung bei 260 nm zeigte deutliche Maxima für die 40S- und 60S-Untereinheiten der 80S-Ribosomen und wies keine Maxima für Polysomen auf.

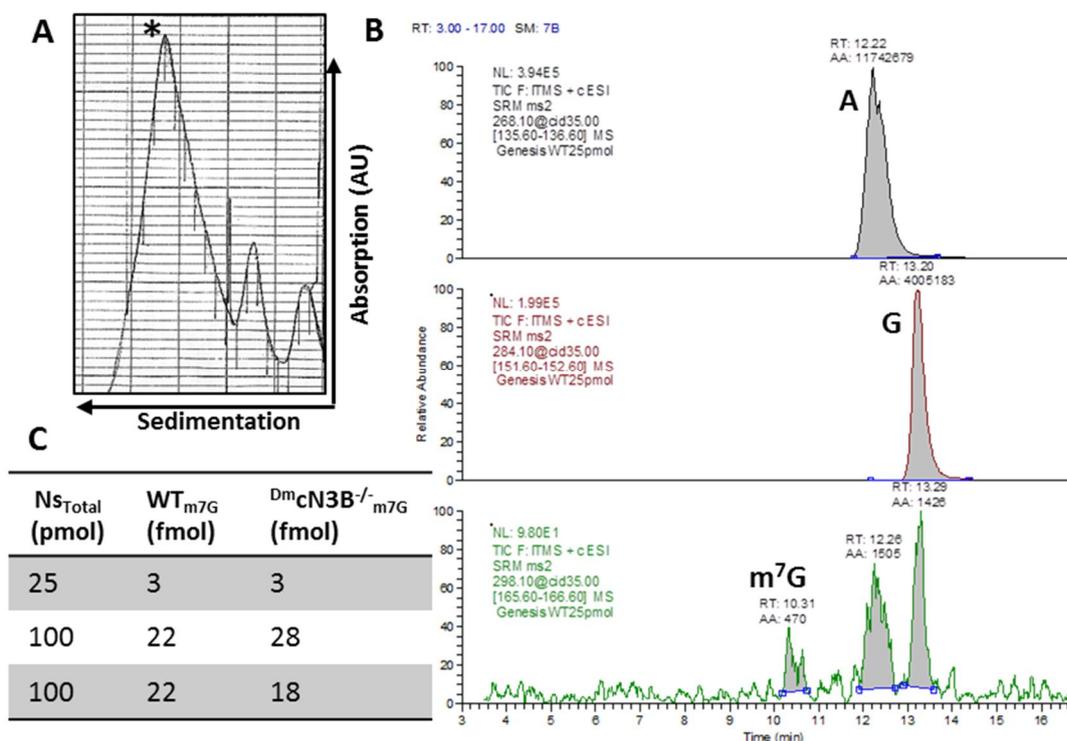


Abb. 3.30 Der Nachweis von m^7G -Nukleosiden in rRNA von Wildtypembryonen und $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen. **A)** Beispielhaftes Profilbild eines Saccharosegradienten, der mit den in EDTA-haltigen Puffer resuspendierten Ribosomenpellets beladen wurde (Absorption bei 260 nm). Die RNA der Peakfraktion (*) wurde extrahiert, gefällt und anschließend mit XRN1 und CIP verdaut, sodass sie gänzlich zu Nukleosiden abgebaut wurde. **B)** Beispielhafte Ionenchromatogramme einer HPLC-MS-Analyse der Nukleoside (25 pmol). Die Massen der angegebenen Nukleoside (Adenosin, Guanosin und 7-Methylguanosin) werden im MS isoliert, fragmentiert und nochmal auf die Masse der entsprechenden Base selektiert. Das Detektorsignal wird anschließend als Ionenchromatogramm aufgezeichnet. Die zwei Peaks im 7-Methylguanosin-Chromatogramm, die bei den Retentionszeiten von Adenosin und Guanosin zu sehen sind, sind Artefakte die durch den großen Überschuss dieser Nukleoside in der Mischung entstehen. **C)** Eine Quantifizierung der 7-Methylguanosin-Abundanz ergab keine eindeutige Anreicherung von 7-Methylguanosin in rRNA der $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zum Wildtyp, auch wenn eine große Menge an Nukleosiden (100 pmol) analysiert wurde. Als Grundlage für die Umrechnung der Flächen in Stoffmengen diente die untergemischte Menge an deuteriertem m^7G .

Anschließend wurde die rRNA aus Wildtypextrakt und Dm cN3B^{-/-}-Extrakt aus den Hauptfraktionen beider Untereinheiten gereinigt. Die rRNA wurde mit der 5'→3'-Exonuklease XRN1 zu 5'-Nukleosidmonophosphaten abgebaut. Durch die anschließende Behandlung mit *calf intestinal phosphatase* (CIP), einer unspezifischen Phosphatase, erfolgte der weitere Abbau der 5'-NMPs zu Phosphat und den entsprechenden Nucleosiden. Die so präparierten Nucleoside wurden mittels quantitativer HPLC/MS-Analyse auf ihre Zusammensetzung hin analysiert (s. 5.6.7). Um eventuelles m⁷G gegen den großen Überschuss an anderen Nucleosiden quantifizieren zu können, wurde den Proben vor der Analyse noch eine definierte Menge an deuteriertem m⁷G (12,5 pmol) beigemischt. Die Auftrennung der Nucleoside über RP-HPLC mit anschließender MS-Identifizierung und Quantifizierung ergab jedoch keine Anreicherung von m⁷G in rRNA der Dm cN3B^{-/-}-Embryonen im Vergleich zum isogenen Wildtyp (s. Abb. 3.30.B und C). Es wurde daher geschlossen, dass eventuell akkumulierendes m⁷GMP im Zytosol der Embryonen nicht zu dessen Einbau in Ribonucleinsäure führt.

3.5.5 Veränderungen des zellulären Nucleotidpools in Dm cN3B^{-/-}-Embryonen

Durch den *knockout* der Dm cN3B wurde eine Stabilisierung des freigesetzten m⁷GMPs im Embryoextrakt beobachtet. Zur Überprüfung, ob m⁷GMP im Embryo akkumuliert, wurde die Zusammensetzung des zellulären Nucleotidpools analysiert. Hierbei wurde auch untersucht, ob die Konzentration anderer 5'-Nucleotide durch die Deletion der Dm cN3B beeinflusst wurde, da dieses Enzym u.a. auch 5'-CMP und 5'-UMP gut umsetzen kann (s. 3.1.9).

Es wurden Embryonen (0-4 h) von Wildtypfliegen, sowie Dm cN3B^{-/-}-Fliegen gesammelt, dechorionisiert und durch eine Behandlung mit Perchlorsäure und Kaliumcarbonat aufgeschlossen (s. 5.6.8). Durch mehrfache Zentrifugation wurden Zellbestandteile, wie Proteine, Nucleinsäuren und Fette pelletiert bzw. abgetrennt, während freie Nucleotide im Überstand verblieben. Die Zusammensetzung des wässrigen Überstandes wurde dann über Ionenpaar-*reversed phase*-HPLC (IP-RP-HPLC, C18-Säule Supercosil®, s. 5.6.9) untersucht. Durch die gewählten Bedingungen wurden alle

abundanten 5'-Nucleosidtriphosphate, -diphosphate und -monophosphate in einem Lauf voneinander getrennt (s. A.1.1.6). Die Normalisierung der einzelnen Läufe erfolgte dabei auf die eingesetzte Feuchtmasse an Embryonen. Zur quantitativen Bestimmung der detektierten Nucleotide wurde die HPLC-Methode mit Standardsubstanzen geeicht, und über die Anstiege der erhaltenen Eichgeraden die Nucleotidkonzentrationen berechnet. In Abb. 3.31 sind vergleichend die gemittelten Nucleotidkonzentrationen von fünf biologisch unabhängigen Wildtypembryoextrakten und $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryoextrakten dargestellt.

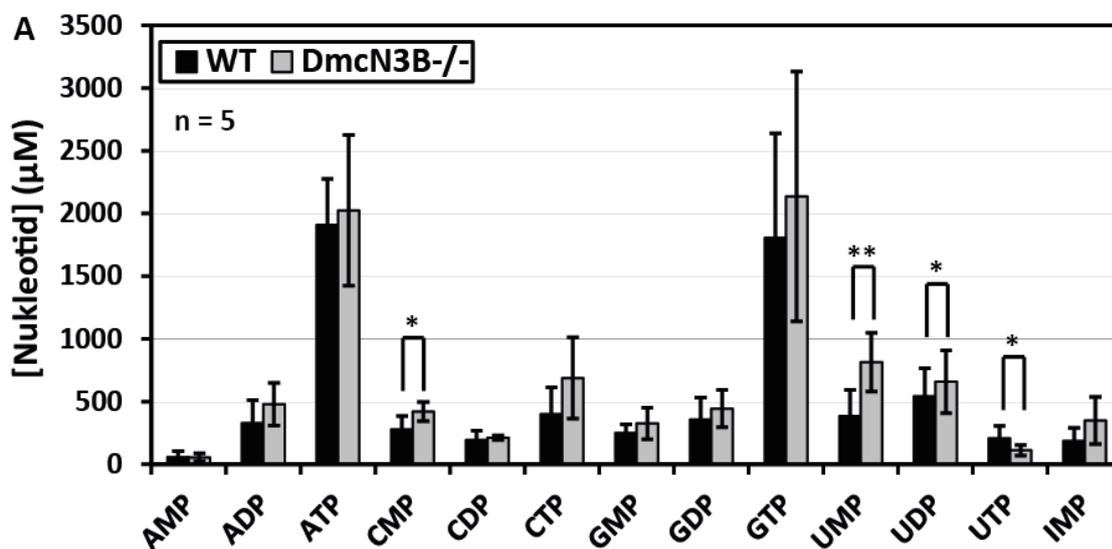


Abb. 3.31 Nucleotidprofil von Nucleotidextrakten aus Wildtypembryonen und $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryonen. Die Nucleotide wurden aus Embryonen (0-4 h, 100 mg Feuchtmasse) nach dem Perchlorsäure/ K_2CO_3 -Protokoll extrahiert und 50 μL von diesen Nucleotidextrakten auf eine C18-Supercosil-Säule geladen und eine IP-RP-HPLC durchgeführt. Mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors wurde die Absorption während der Chromatographie bei allen Wellenlängen zwischen 200 bis 400 nm dokumentiert. Die einzelnen Nucleotide wurden über die Retentionszeiten von Standardsubstanzen, sowie ihrem Absorptionsprofil identifiziert. Die Peaks wurden über das Programm LaChrom7000 quantifiziert und die Konzentrationen der Nucleotide durch eine Eichung der HPLC-Methode mit Standardsubstanzen ermittelt. Es wurden jeweils fünf unabhängige Extrakte präpariert und die Signifikanz über einen zweiseitigen Student-T-Test ermittelt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$).

In der Mutante wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für die 5'-Nucleosidmonophosphate CMP und UMP detektiert, mit einem 1,5fachen und 2,1fachen Anstieg. Diese Akkumulation lässt sich leicht mit den bereits bekannten enzymkinetischen Parameter der $Dm\text{cN3B}$ erklären, die neben $m^7\text{GMP}$ auch bevorzugt Pyrimidinnucleotide umsetzte. Die Nucleotidkonzentrationen von 5'-AMP und 5'-GMP wurden durch den Verlust von $Dm\text{cN3B}$ kaum beeinflusst. Insbesondere der U-

Nukleotidpool wurde durch den *knockout* des *Dm**cn3b*-Gens gestört, mit einem moderaten Anstieg der UDP-Konzentration (1,2facher Anstieg) in den *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryonen und einer Halbierung der UTP-Konzentration (von 207±100 auf 112±43 µM). Auffällig war an dieser Stelle, dass ausschließlich die UTP-Konzentration im *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryo im Vergleich zum Wildtyp reduziert vorlag, während alle anderen NTP-Konzentrationen eher leicht erhöht waren, insbesondere CTP (von 400±219 auf 688±331 µM). Der NDP-Pool wies kaum Schwankungen auf, mit Ausnahme von UDP. Das Nukleotid m⁷GMP wurde weder im Wildtyp noch in der Mutante detektiert, was zum einem vermutlich an dessen geringer Abundanz liegt (Detektionsgrenze bei 5 µM), und zum anderen an mangelnder Peakauftrennung zu anderen Substanzen mit höherer Abundanz.

Der Energiestatus wurde durch den *knockout* von *Dm**cn3b* nicht signifikant beeinflusst, und liegt mit 0,88 im physiologisch erwarteten Bereich zwischen 0,8-0,95 (s. Tab. 3.9; Atkinson und Walton 1967). Das Verhältnis von ADP zu ATP war im *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryo mit 0,24 leicht erhöht im Vergleich zum Wildtypembryo. Auch die Gesamtkonzentration aller erfassten Purinnukleotide und Pyrimidinnukleotide war in der Mutante jeweils fast um 1 mM erhöht, d.h. in den *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryonen lagen insgesamt fast 2 mM mehr Nukleotide vor.

Tab. 3.9 Nukleotidpoolanalyse von Wildtypembryonen und *Dmcn3B*^{-/-}-Embryonen.** Der Energiestatus wurde nach der Formel $([ATP]+0,5 \cdot [ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ berechnet. In die Berechnung der Gesamtkonzentration an Purinen wurden alle A-Nukleotide, sowie G-Nukleotide und 5'-IMP mit einbezogen. Zur Bestimmung des Pyrimidinpools wurden die Konzentrationen aller C-Nukleotide und U-Nukleotide addiert.

Extrakt	Energiestatus	[ADP]/[ATP]	Purinpool (mM)	Pyrimidinpool (mM)
Wildtyp	0,90	0,17	4,89	2,0
<i>Dm</i> <i>cn3B</i> ^{-/-}	0,88	0,24	5,81	2,91

3.5.6 *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryonen weisen eine signifikant erhöhte dTTP-Konzentration auf

Es wurden zwar Verschiebungen im zellulären Nukleotidpool der *Dm**cn3B*^{-/-}-Embryonen festgestellt, dennoch waren diese nicht so ausgeprägt, dass sie den beobachteten Phänotyp in den frühen Phasen der Embryogenese wahrscheinlich machen. In diesen Phasen findet im Embryo besonders viel DNA-Synthese statt, daher stellte sich die

Frage, ob der *knockout* von $Dm\text{cN3B}$ eventuell auch Einfluss auf den dNTP-Pool hat. Im Allgemeinen ist die zelluläre Konzentration der dNTPs um einen Faktor 10-100 niedriger als die der NTPs. Daher wurde der dNTP-Pool nicht über eine HPLC-basierende Methode untersucht. Die dNTP-Konzentrationen wurden enzymatisch bestimmt mit Hilfe eines DNA-Polymerase basierenden Assaysystems (Ferraro et al. 2010; Sherman und Fyfe 1989). Hierfür wurden dieselben Nukleotidextraktionen aus Wildtypembryonen und $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryonen wie für die Bestimmung der Ribonukleotidpools verwendet. Die Konzentration der einzelnen dNTPs wurde über den proportionalen Einbau von radioaktiv markiertem $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP bzw. für die Bestimmung von dATP über den Einbau von $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dTTP in spezifische Oligodesoxynukleotide bestimmt (s. Abb. 3.32, s. 5.6.11). Die ermittelten dNTP-Konzentrationen lagen dabei im physiologischen Erwartungsbereich von 10-50 μM , obwohl dATP sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante unterrepräsentiert vorlag. Zum Vergleich wiesen HeLa-Zellen folgende dNTP-Konzentrationen auf (Song et al. 2003): dATP 35 μM , dTTP 30 μM , dCTP 15 μM und dGTP 7 μM .

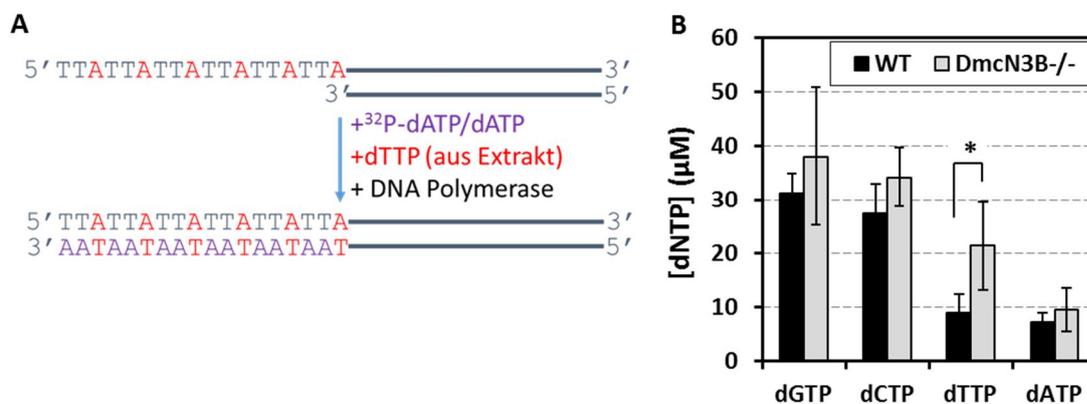


Abb. 3.32 Bestimmung des dNTP-Pools von $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryonen und Wildtypembryonen. **A)** Der Assay basiert auf dem enzymatischen Einbau von dNTPs in speziell designte Oligodesoxynukleotide durch eine DNA-Polymerase. Dabei erfolgt die Konzentrationsbestimmung des zu messenden Nukleotids (hier dTTP), durch den proportionalen Einbau von ^{32}P -radioaktiv markiertem dATP. **B)** Profil des dNTP-Pools in Wildtypembryonen (schwarz) und $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryonen (grau). Es handelte sich um dieselben Nukleotidextraktionen, die für die Nukleotidpoolanalysen verwendet wurden (s. Abb. 3.31). Es wurden jeweils fünf unabhängige Extrakte präpariert und die Signifikanz über einen zweiseitigen Student-T-Test ermittelt (* = $p \leq 0,05$).

Die Messungen zeigten auch, dass in den $Dm\text{cN3B}^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zum Wildtyp mehr dNTPs detektiert werden konnten (insgesamt ca. 30 μM mehr).

Besonders die dTTP-Konzentration war in den Mutantenembryonen um einen Faktor von 2,4 signifikant erhöht. Hierbei ist zu beachten, dass die Nukleotidextrakte der Dm cN3B^{-/-}-Embryonen nach 12 h Entwicklungszeit zu 50% normal entwickelnde Embryonen enthielten, also auch 50% morphologisch auffällige Embryonen. Die dNTP-Konzentrationen eines einzelnen Embryos könnten sich durchaus von den gemittelten Werten unterscheiden. Leider war die Ermittlung der dNTP-Konzentrationen einzelner Embryonen mit dem gewählten Assayssystem aufgrund der limitierten Sensitivität nicht möglich.

3.5.7 Dm cN2-knockout mit dem CRISPR-Cas 9-System

In *D. melanogaster* wurden nur zwei der kanonischen zytosolischen 5'-Nukleotidasen über Sequenzvergleiche ausgemacht (s. A.1.II.1), daher war auch ein *knockout* der Dm cN2 von Interesse.

Mit Hilfe des CRISPR-Cas 9-Systems wurden Dm cN2-knockout-Fliegen erzeugt, bei denen ein Großteil des Dm cn2-Gens deletiert wurde, insbesondere die essentiellen Sequenzen für die Katalyse (s. Abb.3.33.A, in Kooperation mit Matthias Walther, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gunter Reuter, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Bassett und Liu 2014; Gratz et al. 2013). Es wurde darauf verzichtet, das gesamte Gen zu deletieren, da in einem größeren Intronbereich noch ein weiteres Gen kodiert vorlag, das CG34328 (s. Abb. 3.33.B; s. 3.3.1). Der Erfolg der Deletion wurde mittels PCR überprüft (s. Abb. 3.33.C).

Die Dm cN2-knockout-Fliegen waren in ihrer Entwicklung völlig unauffällig und verhielten sich sowohl in ihrer Embryogenese als auch in der späteren Entwicklung wie Wildtyp-Fliegen. Bei der Bestimmung der Gesamtnachkommenschaft (s. 3.5.2) einer festen Anzahl an Elterntieren zeigte sich kein Unterschied zu einer vergleichbaren Kreuzung von Wildtyptieren (s. Abb. 3.34.A). Auch eine Färbung der Dm cN2^{-/-}-Embryonen mit DAPI zeigte keine morphologisch ungewöhnlichen Embryonen (Daten nicht gezeigt).

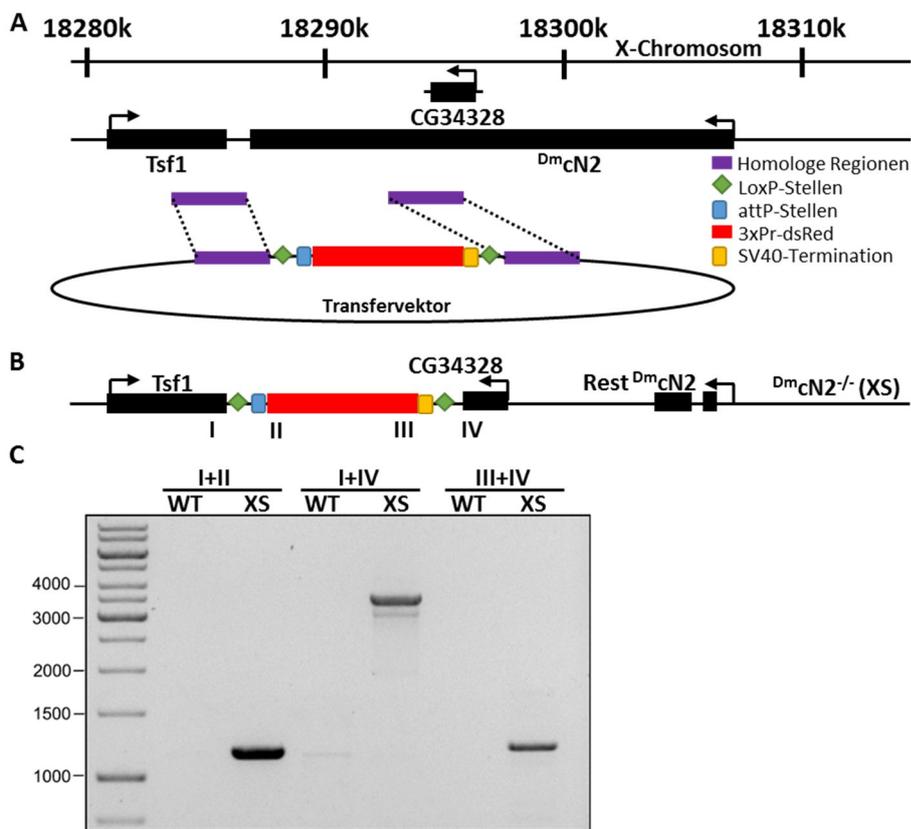


Abb. 3.33 Generierung eines Dm cN2-knockout-Fliegenstammes mittels des CRISPR-Cas 9-Systems. A) Schematische Darstellung des Dm cN2-Gens auf dem X-Chromosom, sowie des verwendeten Transfervektors mit seinen zum Dm cN2-Gen homologen Bereichen. Der Transfervektor bietet die Möglichkeit phänotypische Marker in den durch die Cas 9-Nuklease erzeugten Deletionsbereich einzuführen (hier ds-Red). **B)** Schematische Darstellung des fertigen Deletionsproduktes. Bis auf wenige 5'-gelegene Sequenzen, die nicht die katalytischen Motive enthielten, wurde das Dm cN2-Gen deletiert ohne das *tsf1*-Gen, noch das CG34328-Gen zu beschädigen. **C)** Die Deletion wurde mit Hilfe von PCR-Analysen überprüft. Hierfür wurden die in B) gekennzeichneten Positionen durch Oligodesoxynukleotide erkannt und spezifische PCR-Produkte für das Deletionsprodukt XS (= Dm cN2^{-/-}) erhalten.

Da die gefundenen Effekte des Dm cN2-knockouts überraschend moderat waren, lag der Gedanke nahe, dass eventuell eine andere 5'-Nukleotidase den Verlust der Dm cN2 kompensieren kann. Hierfür wurde eine Westernblotanalyse mit adulten Wildtypfliegen und Fliegen der Dm cN3B- und der Dm cN2-Mutante durchgeführt (s. Abb. 3.34.B). In der Tat wurde eine leicht gesteigerte Expression der Dm cN3B in Dm cN2^{-/-}-Fliegen festgestellt (in Männchen 1,9fach und in Weibchen 1,4fach). Da die Dm cN3B und die Dm cN2 in ihrem Substratspektrum überlappen wäre es durchaus möglich, dass die Dm cN3B den Verlust der Dm cN2 weitestgehend ausgleichen kann.

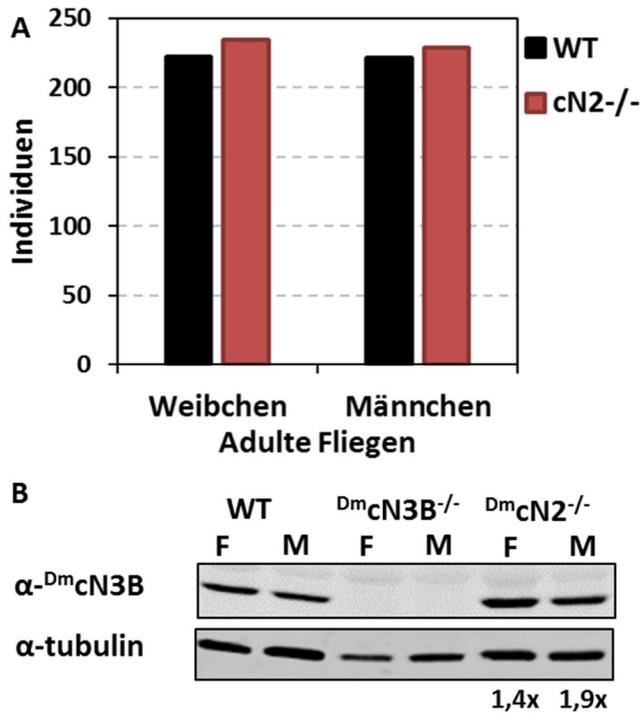


Abb. 3.34 Bestimmung der Anzahl der Nachkommenschaft der $DmCn2^{-/-}$ -Fliegen und eine Westernblotanalyse zur Überprüfung der $DmCn3B$ -Expression in $DmCn2^{-/-}$ -Fliegen. A) Experiment wie in Abb. 3.27 beschrieben. Es wurde kein Unterschied in der Anzahl der Nachkommen zwischen einer Wildtypkreuzung und einer $DmCn2^{-/-}$ -Fliegenkreuzung festgestellt. B) Eine Westernblotanalyse auf adulte Wildtypfliegen, Fliegen der $DmCn3B$ -Mutante und der $DmCn2$ -Mutante. Die Expression der $DmCn3B$ wurde mit dem α - $DmCn3B$ -Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurde die Expression von α -Tubulin bestimmt. Die Faktoren sind eine Mittlung aus drei Westernblotanalysen mit biologisch unabhängigen Fliegenextrakten.

Die Untersuchung des zellulären Nukleotidpools bestätigte diese Theorie, denn sie zeigte nur einen signifikanten Anstieg an 5'-GMP in 0-12 h-alten $DmCn2^{-/-}$ -Embryonen (s. Abb. 3.35; um Faktor 1,4). Die $DmCn2$ setzt sehr effektiv sowohl 5'-IMP, als auch 5'-GMP um, sodass ein Anstieg dieses Substrates in $DmCn2^{-/-}$ -Embryonen nicht überraschend war. Unerwartet hingegen war eine signifikante Reduktion der 5'-IMP-Konzentration auf ca. 44%. Alle weiteren 5'-NMPs waren vom $DmCn2$ -knockout nicht signifikant beeinflusst. Dasselbe gilt auch für die NDPs und NTPs.

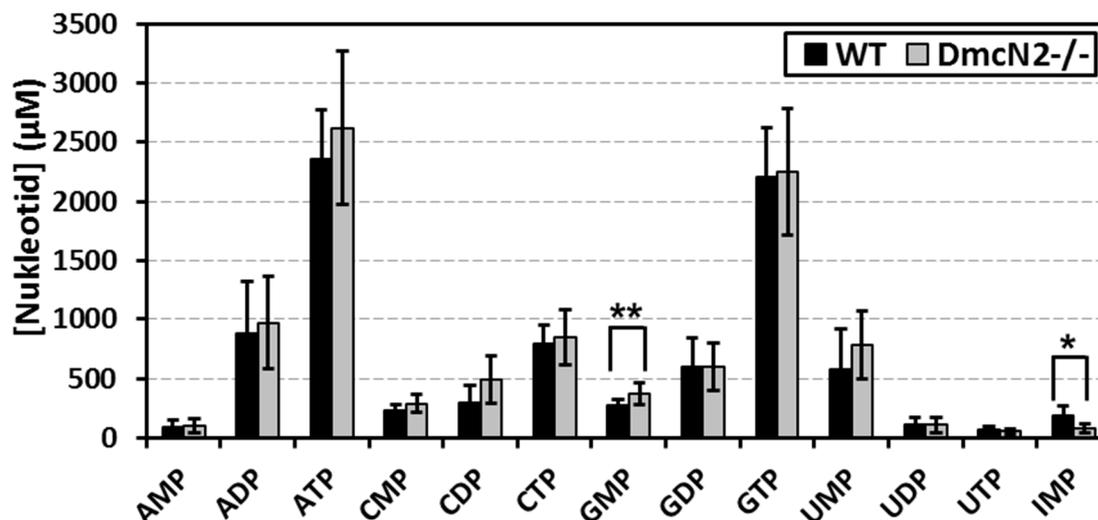


Abb. 3.35 Nucleotidprofil von Nucleotidextrakten aus Wildtypembryonen und ^{Dm}cN2^{-/-}-Embryonen. Die Nucleotide wurden aus Embryonen (0-4 h, 100 mg Feuchtmasse) nach dem Perchlorsäure/K₂CO₃-Protokoll extrahiert und 50 μL von diesen Nucleotidextrakten auf eine C18-Supercosil-Säule geladen und eine IP-RP-HPLC durchgeführt. Mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors wurde die Absorption während der Chromatographie bei allen Wellenlängen zwischen 200 bis 400 nm dokumentiert. Die einzelnen Nucleotide wurden über die Retentionszeiten von Standardsubstanzen, sowie ihrem Absorptionsprofil identifiziert. Die Peaks wurden über das Programm LaChrom7000 quantifiziert und die Konzentrationen der Nucleotide durch eine Eichung der HPLC-Methode mit Standardsubstanzen ermittelt. Es wurden jeweils fünf unabhängige Extrakte präpariert und die Signifikanz über einen zweiseitigen Student-T-Test ermittelt (* = p≤0,05; ** = p≤0,01).

Dadurch wurden auch keine Differenzen im Energiestatus, noch im Verhältnis von [ADP]/[ATP], zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt (s. Tab. 3.10). Jedoch wurde auch in den ^{Dm}cN2-Mutanten ein leicht erhöhter Gesamtgehalt an Purinen und Pyrimidinen beobachtet (insgesamt ca. 0,9 mM mehr).

Tab. 3.10 Nucleotidpoolanalyse von Wildtypembryonen und ^{Dm}cN2^{-/-}-Embryonen. Der Energiestatus, sowie die Gesamtkonzentrationen an Purinen und Pyrimidinen wurden wie in Tab. 3.9 berechnet.

Extrakt	Energiestatus	[ADP]/[ATP]	Purinpool (mM)	Pyrimidinpool (mM)
Wildtyp	0,84	0,37	6,59	2,09
^{Dm} cN2 ^{-/-}	0,84	0,37	7,0	2,58

4 Diskussion

4.1 Die Substratspezifität der untersuchten 5'-Nukleotidasen ist gut konserviert

In dieser Arbeit wurden zytosolische 5'-Nukleotidasen aus Mensch und Taufliege untersucht, die die Dephosphorylierung verschiedener 5'-NMPs katalysieren. Ausgangspunkt war die Entdeckung einer neuartigen 5'-Nukleotidaseaktivität in *D. melanogaster*, eines Enzyms das spezifisch die Dephosphorylierung von m^7GMP katalysiert, eines methylierten 5'-GMP-Derivates. Die Aminosäuresequenz dieser Nukleotidase ist gut konserviert und wurde in evolutionär jüngeren Organismen mit jeweils zwei Isoformen gefunden (Variante A und B, s. A.1.1.2). Es sind bereits zahlreiche zytosolische 5'-Nukleotidasen aus Mensch bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität stark unterscheiden (s. Tab. 2.1). Die m^7GMP -spezifische 5'-Nukleotidase aus *D. melanogaster* ist ein Homologes zur bereits beschriebenen humanen pyrimidinspezifischen 5'-Nukleotidase 3A (s. 2.4.2) und zu der bis jetzt nicht charakterisierten Variante 3B. Aufgrund katalytischer und sequenzieller Ähnlichkeit wurde das *D. melanogaster*-Enzym als $^{Dm}cN3B$ bezeichnet. Die $^{Dm}cN3B$ sowie die $^{Hs}cN3A$ und die $^{Hs}cN3B$ wurden in dieser Arbeit auf ihre Substratspezifität hin untersucht.

Die 5'-Nukleotidase aus *D. melanogaster* besaß die höchste katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für m^7GMP ($553600 M^{-1}\cdot s^{-1}$). Ebenfalls sehr gute Substrate waren die 5'-Pyrimidinnukleotide CMP und UMP (264300 und $26600 M^{-1}\cdot s^{-1}$). Außerdem setzte die 5'-Nukleotidase auch das Desoxynukleotid 5'-dUMP mit einer guten katalytischen Effizienz um. Purinnukleotide, wie 5'-AMP und 5'-GMP, wurden von der $^{Dm}cN3B$ mit einer geringeren katalytischen Effizienz umgesetzt (ca $9000 M^{-1}\cdot s^{-1}$). Hierbei war insbesondere die stringente Diskriminierung zwischen den Substraten 5'-GMP und m^7GMP aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit überraschend (um Faktor 60), was die Spezifität der 5'-Nukleotidase für m^7GMP nur unterstreicht. Unerwarteterweise katalysierte die $^{Dm}cN3B$ auch die schrittweise Dephosphorylierung von m^7GDP . Eine Dephosphorylierung von Dinukleotiden wurde bis jetzt noch nicht für

zytosolische 5'-Nukleotidasen beschrieben. Die Dephosphorylierung ging jedoch mit einem vergleichsweise niedrigen k_{cat} -Wert (32fach niedriger als für $m^7\text{GMP}$) vonstatten. Desweiteren wurde für dieses Enzym auch eine Inhibition durch hohe 5'-AMP-Konzentrationen beobachtet (K_i -Wert von 2 mM). Dadurch wäre eine Kopplung der Enzymaktivität an den zellulären Energiestatus denkbar. Unter Energiemangel akkumuliert 5'-AMP in der Zelle und würde somit die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ -Aktivität vermindern. Damit würden andere 5'-NMPs nicht weiter dephosphoryliert werden und in ihrer phosphorylierten Form in der Zelle gehalten werden. Insbesondere unter Energiemangelsituationen ist der Erhalt der Nukleotidbausteine für den zellulären Nukleotidpool wichtig. Außerdem liegen die K_M -Werte der $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ für die getesteten 5'-NMPs alle unter den ermittelten zellulären Nukleotidkonzentrationen in frühen Embryonen. Es ist also davon auszugehen, dass die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ die 5'-NMPs mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten umsetzt.

Die humane cN3B wies für $m^7\text{GMP}$ im Vergleich mit anderen getesteten Substraten den niedrigsten K_M -Wert auf ($8 \pm 2 \mu\text{M}$). Vergleicht man jedoch die katalytischen Effizienzen des Enzyms für alle getesteten Substrate, bevorzugte es das Substrat 5'-CMP um einen Faktor von 1,5 vor $m^7\text{GMP}$, dem nächstbesseren Substrat. Die $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ wies im Vergleich zur $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ eine stringenter Unterscheidung zwischen Pyrimidin- und Purinsubstraten auf. So wurden die Pyrimidinnukleotide 5'-CMP und 5'-UMP mit einer katalytischen Effizienz von 87000 und 14000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ umgesetzt, währenddessen für 5'-AMP nur eine katalytische Effizienz von 88 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt wurde. Dies ist in Hinblick auf die Existenz der anderen humanen 5'-Nukleotidasen nicht unerwartet. Insbesondere für den Umsatz von 5'-AMP wurden im Menschen bereits zwei zytosolische 5'-Nukleotidasen identifiziert ($^{\text{Hs}}\text{cN1A}$ und $^{\text{Hs}}\text{cN1B}$; Hunsucker et al. 2005). Die $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ wurde nicht durch hohe 5'-AMP-Konzentrationen inhibiert. Es wurde jedoch eine Aktivierung durch niedrige Phosphatkonzentrationen festgestellt. In humanen Erythrozyten und Muskelzellen wurde eine zelluläre Phosphatkonzentration von 0,5 bis 5 mM festgestellt, somit könnte die Aktivierung durch die zelluläre Phosphatkonzentration durchaus stattfinden (Bevington et al. 1986).

Die humane cN3A setzte 5'-CMP wie erwartet mit einer sehr hohen katalytischen Effizienz von $118600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ um. Überraschenderweise war jedoch auch die $^{\text{Hs}}\text{cN3A}$ in der Lage die Dephosphorylierung von m^7GMP zu katalysieren, obwohl postuliert worden war, dass diese zytosolische 5'-Nukleotidase keine Purinnukleotide umsetzen kann (Grobosky et al. 2012). Die $^{\text{Hs}}\text{cN3A}$ bevorzugte jedoch 5'-CMP als Substrat um einen Faktor von 5,2 vor m^7GMP . In der Datenbank des *human protein atlas* wurde sowohl für die $^{\text{Hs}}\text{cN3A}$ als auch die $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ eine Proteinexpression in den meisten untersuchten Geweben gezeigt (www.proteinatlas.org; NT5C3A und NT5C3B). Eine Präferenz für eine bestimmte Gewebegruppe ließ sich nicht ableiten. Bis auf wenige Ausnahmen überlappte die Expression beider Enzyme in den untersuchten Geweben. Vermutlich kann daher der Verlust der enzymatischen Aktivität einer Isoform durch die andere kompensiert werden. Es wäre folglich interessant zu untersuchen, wie die Aktivität der $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ im Falle eines Mangels an $^{\text{Hs}}\text{cN3A}$ den beobachteten klinischen Phänotyp (die hämolytische Anämie, s. 2.4.2) beeinflusst. Eventuell sorgt die Existenz der $^{\text{Hs}}\text{cN3B}$ dafür, dass der Phänotyp bei $^{\text{Hs}}\text{cN3A}$ -Mangel nur eine milde Ausprägung erfährt.

Durch Sequenzvergleiche mit den bekannten humanen 5'-Nukleotidasen wurde nur noch eine weitere zytosolische 5'-Nukleotidase in *D. melanogaster* ausgemacht (s. A.1.II.1): ein Homologes zur humanen cN2. Die humane cN2 gilt als purinspezifische 5'-Nukleotidase (s. 2.4.1), daher wurde untersucht ob das Homologe aus *D. melanogaster* auch die Dephosphorylierung von m^7GMP katalysieren kann, einem Purinnukleotid. Die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ wurde mit verschiedenen Substraten getestet und zeigte eine klare Präferenz für die Purinnukleotide 5'-IMP und 5'-GMP. Die katalytische Effizienz für 5'-AMP war überraschend niedrig (unter $50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), daher ist vermutlich die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ für die Dephosphorylierung dieses Nukleotides verantwortlich, bzw. ein anderes Enzym. Die $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ setzte m^7GMP mit einer sehr niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit um, sodass davon auszugehen ist, dass hauptsächlich die $^{\text{Dm}}\text{cN3B}$ den Umsatz von m^7GMP katalysiert.

Der Vollständigkeit halber wurde die humane cN2 ebenfalls auf den Umsatz von m^7GMP getestet. Ähnlich der $^{\text{Dm}}\text{cN2}$ katalysierte die $^{\text{Hs}}\text{cN2}$ den Umsatz von m^7GMP nur

geringfügig. Im Menschen sind damit vermutlich vorrangig die cN3-Nukleotidasen für eine Dephosphorylierung von m^7GMP verantwortlich.

4.2 Kristallstrukturanalysen der 5'-Nukleotidasen erklären deren Substratspezifität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kristallstrukturen der $^{Dm}cN3B$ durch Dr. Thomas Monecke gelöst und analysiert (Monecke et al. 2014). Hierfür wurde die $^{Dm}cN3B$ zum einen in Gegenwart von N7-Methylguanosen kristallisiert und zum anderen in Gegenwart von Cytidin (PDB-ID: 4NVO und 4NWI). In beiden Kristallstrukturen der $^{Dm}cN3B$ waren alle typischen, strukturellen Merkmale einer HAD-5'-Nukleotidase nachweisbar: die *cap*- und die Kerndomäne mit ihrem HAD-Motiv, sowie das *squiggle*- und das *flap*-Element in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum (Burroughs et al. 2006). Beide Produkte, 7-Methylguanosen und Cytidin, wurden im Enzym in einem hydrophoben Käfig aus drei Aminosäuren koordiniert: Phenylalanin 75, Tryptophan 120 und Tryptophan 121. Das Purinringsystem des 7-Methylguanosen ist zwischen den Ringanteilen des Phenylalanins 75 und des Tryptophans 120 parallel gestapelt. Hierbei wirken insbesondere die π - π -Wechselwirkungen stabilisierend. Das Tryptophan 121 ist mit seinem aromatischen Ring genau T-förmig zur positiven Ladung des N7-Methylguanosen ausgerichtet. Diese zusätzliche Coulomb-Wechselwirkung zwischen den π -Elektronen des Ringsystems und der positiven Ladung des Purinrings sorgen vermutlich für die stringente Unterscheidung zwischen m^7GMP und dem nichtmethylierten 5'-GMP, welches keine positive Ladung besitzt. Im Vergleich zum *D. melanogaster*-Enzym weisen die humanen Homologen cN3A und cN3B eine andere Zusammensetzung der hydrophoben Tasche auf: Die $^{Hs}cN3A$ besitzt dort ein Histidin anstatt eines Phenylalanins an Position 75, ein Asparagin anstelle eines Glycins an Position 76 sowie ein Tyrosin anstelle eines Tryptophans an Position 121. Die $^{Hs}cN3B$ dagegen besitzt ein Tyrosin anstelle eines Phenylalanins an Position 75. Zu Beginn dieser Arbeit wurde vermutet, dass das Doppeltryptophanmotiv (Try120 und Try121) ausschlaggebend für die hohe katalytische Effizienz der 3B-Variante für m^7GMP wäre. Jedoch sorgte die Einführung der gesamten Substratbindetasche der $^{Hs}cN3A$ in den $^{Dm}cN3B$ -Hintergrund nicht für einen Verlust der m^7GMP -

Dephosphorylierungsaktivität. Durch die Darstellung und Testung der ^{Hs}cN3A wurde klar, dass auch dieses Enzym m⁷GMP sehr gut umsetzen kann, obwohl dieses Enzym als ausschließlich pyrimidinspezifisch beschrieben worden ist (Grobosky et al. 2012; Bitto et al. 2006). Durch die Mutation der ^{Dm}cN3B-Substratbindetasche zum ^{Hs}cN3A-Motiv wurde lediglich die katalytische Effizienz für m⁷GMP um einen Faktor von 10 gesenkt und war damit der katalytischen Effizienz der ^{Hs}cN3B und ^{Hs}cN3A für m⁷GMP ähnlicher. Für die Diskriminierung gegenüber Purinen wurde ein Asparagin in der Substratbindetasche verantwortlich gemacht (in der ^{Mm}cN3A Asparagin 69, Grobosky et al. 2012). Durch *molecular docking*-Studien wurde jedoch gezeigt, dass dieses Asparagin auch andere Konformationen einnehmen kann (Rotamere) und dadurch eine Erweiterung der Substratbindetasche möglich wird (Monecke et al. 2014).

Die ^{Dm}cN3B zeigte sich unempfindlich gegenüber oxidativen Bedingungen, obwohl für die humanen Homologen eine Oxidationsempfindlichkeit nachgewiesen wurde (diese Arbeit und Grobosky et al. 2012). Durch Kristallstrukturanalysen der ^{Mm}cN3A wurden hierfür zwei Cysteine im Enzym identifiziert, die zur Oberfläche exponiert vorlagen: Cystein 34 und 64. In der ^{Dm}cN3B-Kristallstruktur wurden durch Strukturvergleiche mit der ^{Mm}cN3A (Pymol®, mit PDB-IDs: 4NV0 und 4FE3) an diesen Stellen keine Cysteine nachgewiesen, sondern ein Asparagin (Asn40) und ein Alanin (Ala70). Es wurden außerdem keine anderen Cysteine ausgemacht, die zur Oberfläche des Enzyms gerichtet waren. Somit wäre die Unempfindlichkeit der ^{Dm}cN3B durch die fehlenden Cysteine erklärbar. Die ^{Hs}cN3B hingegen ist empfindlich gegenüber oxidierenden Bedingungen. Durch Sequenzvergleiche mit der ^{Mm}cN3A und der ^{Dm}cN3B (s. A.1.1.2) zeigte sich, dass zwar das Cystein 34 nicht konserviert ist, es findet sich an dieser Stelle ein Glycin in der ^{Hs}cN3B, aber das Cystein 64 (in der ^{Hs}cN3B Cystein 56). Wahrscheinlich verursacht dieses Cystein die beobachtete Sensitivität der ^{Hs}cN3B gegenüber oxidierenden Bedingungen.

Die ^{Dm}cN3B kann auch die Dephosphorylierung des Desoxynukleotids 5'-dUMP katalysieren. Für die Erkennung des Riboseanteils des Ribonukleotids ist der hochkonservierte Glutamatrest 103 (in der ^{Mm}cN3A Glutamat 96) verantwortlich, welcher zwei Wasserstoffbrücken zum 2'- (2,61 Å) und 3'-OH (2,65 Å) der Ribose

ausbildet (Grobosky et al. 2012). Vermutlich verursacht das fehlende 2'-OH im Desoxynukleotid 5'-dUMP die niedrigere katalytische Effizienz des Enzyms für dieses Substrat im Vergleich zum 5'-UMP, da eine Wasserstoffbrücke weniger ausgebildet werden kann.

Für die Phosphotransferaseaktivität der ^{Mm}cN3A wurden die Aminosäuren an Position 4 und 5 im Motiv I (⁴⁹DFDMT) sowie die Aminosäuren Glutamat 96 und Tyrosin 114 verantwortlich gemacht (bezogen auf die Sequenz der ^{Mm}cN3A; Magni et al. 2013; Bitto et al. 2006). Die ^{Dm}cN3B besitzt anstelle des hochkonservierten Methionins an Position 4 des Motiv I ein Tyrosin (s. A.1.1.2). Nur das Homologe aus *C. elegans* weist an dieser Stelle ebenfalls ein Tyrosin auf (s. A.1.1.2). Außerdem fehlt dem *D. melanogaster*-Enzym der Tyrosinrest 114, denn stattdessen befindet sich an dieser Stelle das bereits diskutierte Tryptophan 121 (Doppeltryptophanmotiv). In dieser Arbeit wurde nicht weiter untersucht, ob diese strukturellen Unterschiede die fehlende Phosphotransferaseaktivität der ^{Dm}cN3B verursachen. Der für die Phosphotransferaseaktivität essentielle Glutamatrest (in der ^{Mm}cN3A Glu96) ist zumindest auch in der ^{Dm}cN3B konserviert (Magni et al. 2013).

Interessanterweise sind die cN2-Enzyme nur sehr schlecht in der Lage m^7GMP umzusetzen, obwohl sie purinspezifische 5'-Nukleotidasen sind (s. 2.4.1). Die cN2-Primärsequenz ist erstaunlich hochkonserviert vergleichbar mit Proteinen wie Histonen und Tubulin. Die Koordination des Purinringsystems von 5'-IMP wird in der humanen ^{Hs}cN2 im Wesentlichen von vier Aminosäuren ermöglicht (Walldén und Nordlund 2011; Walldén et al. 2007): einem Histidin (209), welches parallel gestapelt zum Purinring ausgerichtet ist, einem Phenylalanin (157) und einem Tyrosin (210), welche beide T-förmig zum Purinringsystem orientiert sind, und einem Arginin (202), dessen Seitenkette direkt benachbart zur Carboxygruppe des Purinrings von 5'-IMP ist. Alle diese Aminosäuren sind auch in der ^{Dm}cN2 konserviert, bis auf Tyrosin 210. Durch Sequenzvergleiche wurde hier stattdessen ein Serin im *D. melanogaster*-Enzym gefunden. Interessant ist die Position des Phenylalanins 157. Dieses ist T-förmig zum Stickstoffatom 7 des Purinrings koordiniert, jedoch ist der Abstand zwischen dem Stickstoffatom und dem Phenylringsystem sehr gering (3,4-4,2 Å, PDB-ID: 2XJC).

Vermutlich würde eine zusätzliche Methylierung des Purinrings an dieser Stelle eine korrekte Positionierung des m^7GMPs in der $^{Dm}cN2$, bzw. der $^{Hs}cN2$ erschweren.

4.3 Der spezifische Abbau von m^7GMP

Im Zellinneren existieren neben den kanonischen Nukleotiden noch mehr als 100 andere modifizierte Nukleotidvarianten (Dunin-Horkawicz et al. 2006; Aas et al. 2003). Davon weisen alleine 20 Verbindungen eine bzw. mehrere Methylierungen auf, wie 1-Methyladenin oder 7-Methylguanosin. Solche Modifizierungen vermitteln oft Spezifität, Stabilität und Schutz vor unspezifischem Abbau (Tomikawa et al. 2010; Chernyakov et al. 2008). In tRNA-Molekülen sind diese Modifizierungen besonders wichtig, da sie nicht nur die Stabilität und Faltung der tRNA beeinflussen sondern auch durch ihre Anwesenheit im Anticodonloop-Bereich für die Erkennung des korrekten Codons entscheidend sind (Grosjean et al. 2010; Agris 2008). Die Nukleotidmodifizierungen können jedoch auch die chemischen Eigenschaften der Nukleotide so verändern, dass sie zu deren Destabilisierung beitragen (Greenberg 2012; Asagoshi et al. 2002).

Das Nukleotid m^7GMP wird hauptsächlich durch den enzymatischen Abbau der 5'-*cap*-Struktur eukaryotischer mRNAs freigesetzt (s. 2.5). Die Synthese der 5'- m^7G -*cap*-Struktur erfolgt durch den *capping*-Komplex in drei enzymatisch-katalysierten Schritten (Gu und Lima 2005; Shuman 2001). Die Methylierung des endständigen Guanins wird hierbei durch eine RNA-Guanin-N7-Methyltransferaseaktivität katalysiert, die als Methylgruppen-Donor S-Adenosylmethionin verbraucht (Fabrega et al. 2004). Durch die Übertragung der Methylgruppe auf das N7-Atom des Guanins entsteht eine positive Ladung in dessen Imidazolring. Diese positive Ladung verursacht neben einer Destabilisierung der glykosidischen Bindung zwischen Guanin und der Ribose auch eine erhöhte Rate spontaner Ringöffnungen (Lawley und Brookes 1963). Das 5'- m^7G -*cap* wird also für jedes mRNA-Molekül neu synthetisiert, und freies m^7GMP kann hierfür nicht wiederverwertet werden. Neben der 5'-*cap*-Struktur der mRNAs weisen auch rRNA- und tRNA-Moleküle 7-Methylguanine auf (MODOMICS *database*,

Machnicka et al. 2013; Towns und Begley 2012). Die *turnover*-Rate dieser Moleküle ist jedoch viel geringer als die von mRNA-Molekülen (Phizicky und Hopper 2010; Karnahl und Wasternack 1992). Dadurch trägt ihr Abbau vermutlich nicht maßgeblich zum zellulären Pool an freiem m^7GMP bei. Auch die Aktivität von methylierenden Agenzien wie Dimethylsulfonat (DMS) kann zum Entstehen von 7-Methylguanin in der Zelle beitragen, da die Methylierung der Guaninbase an der N7-Position auch chemisch bevorzugt abläuft (Boysen et al. 2009).

In *D. melanogaster* erfolgt nach 2-2,5 h der Embryogenese der Abbau der maternal eingebrachten Transkripte, da zu diesem Zeitpunkt der Wechsel zur zygotischen Transkription stattfindet (Langley et al. 2014; Schier 2007). Durch den Abbau der maternalen mRNAs wird auch vermehrt m^7GMP ins Zytosol freigesetzt. Wurde m^7GMP mit Extrakt von 0,5-2,5 h alten Wildtypembryonen inkubiert, wurde es innerhalb weniger Minuten zu Phosphat und 7-Methylguanosin abgebaut. Im Vergleich dazu wurde mit Extrakt von $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Embryonen (0,5-2,5 h) kein signifikanter Abbau von m^7GMP mehr festgestellt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist also nur die $^{Dm}cN3B$ für den spezifischen Abbau von m^7GMP während dieser Entwicklungsphase verantwortlich. Der *D. melanogaster*-Embryo liegt bis zum Schlüpfen der Larve als nahezu abgeschlossenes System vor. Fünf verschiedene Schichten, u.a. die Vitellinmembran und eine wasserundurchlässige Wachsschicht, umgeben den Embryo und schützen ihn dadurch vor diversen Umwelteinflüssen (Cavaliere et al. 2008; Margaritis et al. 1980). Die wasserundurchlässige Wachsschicht sorgt jedoch auch dafür, dass bis auf Gase keine Stoffe aus dem Embryo nach außen abgegeben werden können. Das durch den mRNA-Abbau freigesetzte m^7GMP sollte also in $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Embryonen im Zytosol akkumulieren.

Die Existenz eines spezifisch m^7GMP -abbauenden Enzyms mit hoher katalytischer Effizienz legt die Vermutung nahe, dass eine Akkumulation dieses modifizierten Nukleotids in der Zelle verhindert werden soll. Es ist vorstellbar, dass m^7GMP durch die Nukleotidrecyclingwege zu m^7GTP phosphoryliert werden kann und anschließend Eingang in Nukleinsäuren findet. Dazu müsste das m^7GMP zunächst durch eine Nukleosidmonophosphatkinase zu m^7GDP phosphoryliert werden. Es wurde bereits

demonstriert, dass die anschließende Phosphorylierung zum Nukleosidtriphosphat durch die unspezifische Nukleosiddiphosphatkinase katalysiert werden kann (van Dijk et al. 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass m^7GTP durch RNA-Polymerasen in RNA eingebaut werden kann, jedoch handelte es sich in diesen Studien nur um ein prokaryotisches Enzym (Hendler et al. 1970). Ob eine Akkumulation von m^7GMP stattfindet und dies Konsequenzen für den Organismus *D. melanogaster* hat, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht klar beantwortet werden. Durch den *knockout* des *Dm*cN3b-Gens wurde zwar ein Entwicklungsdefekt in den frühen Phasen der Embryogenese beobachtet, jedoch wurde in den Analysen des zellulären Nukleotidpools dieser Embryonen keine Akkumulation von m^7GMP gegenüber Wildtypembryonen festgestellt. Die Sensitivität der verwendeten Methode war jedoch auch limitiert (Nachweisgrenze 5 μM). Außerdem kam erschwerend hinzu, dass kurz nach der erwarteten Retentionszeit des m^7GMP s eine andere Nukleotidspezies eluierte, die bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte, sodass dieser Peak ein eventuelles Signal für m^7GMP vielleicht überlagert hat. Der Einbau von m^7G -Nukleotiden in ribosomale RNA wurde mittels HPLC-MS-Analyse überprüft. Ribosomale RNA der *Dm*cN3B^{-/-}-Embryonen (0,5-4,5 h) wies jedoch keine erhöhte Menge an 7-Methylguanin im Vergleich zu Wildtyp-RNA auf. Daraus wurde geschlossen, dass m^7GMP vermutlich nicht signifikant zu m^7GTP phosphoryliert wird und daher nicht in Ribonukleinsäuren eingebaut werden kann. Theoretisch wäre auch eine Reduktion des m^7GDP s zu m^7dGDP möglich, da die hierfür verantwortliche Ribonukleotidreduktase nicht basenspezifisch ist. Es wurde bereits gezeigt, dass ein Einbau von m^7dGTP in DNA durch DNA-Polymerasen katalysiert werden kann (Hendler et al. 1970). Die Existenz von m^7dG in DNA ist insofern problematisch, als dass durch die verringerte Stabilität des Nukleosids spontan apurinische Stellen in der DNA entstehen und dadurch Einzel- und Doppelstrangbrüche auftreten können (Boysen et al. 2009). Reparaturmechanismen wie das *base excision repair* (BER)-System entfernen im Normalfall solche modifizierten Nukleotide zuverlässig und sorgen damit für den Erhalt der Integrität der DNA (Wyatt und Pittman 2006; Lindahl et al. 1997). Außerdem gilt die N7-Methylierung von Guanin als eine wenig mutagene Modifizierung, solange das

Reparatursystem intakt ist (Boysen et al. 2009). Um zu überprüfen, ob ein Einbau von m^7dGTP in DNA in $^{Dm}cN3B$ -Nullmutanten stattfindet, wurde das DNA-Reparatursystem zusätzlich durch Behandlung mit UV-Licht belastet. Das UV-Licht verursacht DNA-Schäden wie Thymin dimere (Shah und He 2015). Sollten $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Larven bereits DNA-Schäden reparieren müssen, die durch einen Einbau von m^7dGTP verursacht worden sind, sollte eine zusätzliche Belastung durch UV-Licht eine erhöhte Sterblichkeit gegenüber Wildtyp bewirken. Dies war jedoch nicht der Fall. Es handelt sich hierbei jedoch um eine sehr indirekte Methode zur Überprüfung des Einbaus von m^7dGTP in DNA, also kann aus dem Ergebnis nicht klar geschlossen werden, dass kein Einbau stattfindet. Außerdem haben Larven gegenüber Embryonen den Vorteil, dass sie überschüssige Nukleotide durch Ausscheidung aus ihrem Organismus entfernen können.

Ein erstaunliches Merkmal der $^{Dm}cN3B$ ist deren Fähigkeit auch m^7GDP zum 7-Methylguanosin zu dephosphorylieren. Dies ist besonders in Hinblick auf die zwei 5'-*cap*-Abbauwege interessant, da hier aus der 5'-*cap*-Struktur sowohl m^7GMP (DcpS-Aktivität) als auch m^7GDP (Dcp2/1-Aktivität) freigesetzt werden kann (s. 2.5). Diese zusätzliche $^{Dm}cN3B$ -Aktivität bestärkt die Argumentation, dass die $^{Dm}cN3B$ eine „entgiftende“ Funktion besitzt, da sie den Abbau dieses modifizierten Nukleotids in eine exportierbare Form katalysiert. Tatsächlich ist das durch den Abbau freigesetzte m^7GMP durch seinen geladenen Zustand nicht in der Lage, Zellmembranen durch Diffusion zu passieren. Erst durch die Abspaltung des Phosphatanteils wäre wahrscheinlich ein Transport als Nukleosid durch Transporter möglich (Pastor-Anglada et al. 2005; Mangravite et al. 2003). Bei Untersuchungen von Menschen und Ratten, die einem methylierenden Agens ausgesetzt waren, wurden im Urin erhöhte Mengen an 7-Methylguanin festgestellt (Tamae et al. 2009; Stillwell et al. 1991; Sander et al. 1986). Vermutlich spalten im Ektosol befindliche, unspezifische Phosphorylasen den Riboseanteil des 7-Methylguanosins ab (Yegutkin 2008). Das 7-Methylguanin wird dann anscheinend nicht weiter im Körper abgebaut, sondern in dieser Form ausgeschieden.

Reaktionsgeschwindigkeiten dephosphorylieren. Durch eine Dephosphorylierung können Nukleotide zum einen in eine membrangängige Form überführt werden (katabolischer Zweig), zum anderen können sie dadurch in den obengenannten Substratzyklus eingespeist werden und als Nukleoside bzw. Nukleobasen im Zytosol kurzzeitig zwischengespeichert werden (regulatorischer Zweig). Durch die Inhibition der Dm cN3B-Aktivität durch hohe 5'-AMP-Konzentrationen wird außerdem eine Kopplung an den zellulären Energiestatus ermöglicht (s. 4.1). Auch die Dm cN2-Aktivität ist durch ihre Aktivierbarkeit durch hohe ATP-Konzentrationen an den Energiestatus gekoppelt (s. 3.3.4). Ein Verlust der 5'-Nukleotidaseaktivitäten würde zunächst einmal direkt zur Akkumulation von 5'-NMPs führen und indirekt dem Organismus die Möglichkeit nehmen die Menge an verfügbaren 5'-NMPs an den Energiestatus anzupassen. Die akkumulierenden 5'-NMPs sind außerdem Substrate für die Nukleotidrecyclingwege, folglich wäre eine Erhöhung der NDP- und NTP-Konzentrationen denkbar.

Ein Verlust der Dm cN3B-Aktivität durch einen genetischen *knockout* sorgte auf biochemischer Ebene, neben der Stabilisierung von m^7 GMP im Embryonenextrakt, für Veränderungen im zellulären Nukleotidpool und im dNTP-Pool der *D. melanogaster*-Embryonen (s. Abb. 4.2). Die beobachtete signifikante Akkumulation von 5'-CMP und 5'-UMP im Dm cN3B^{-/-}-Embryo ist wenig überraschend, da die Dm cN3B für beide Pyrimidinnukleotide eine hohe katalytische Effizienz aufwies (s. Abb. 4.2). Durch die Aktivität einer 5'-CMP-UMP-Kinase (*dak1*) können diese beiden Nukleotide zu NDPs phosphoryliert werden (Curbo et al. 2003). Besonders der Überschuss an 5'-UMP sorgte dadurch vermutlich für den signifikanten Anstieg an UDP. Es wurde außerdem eine signifikante Depletion des UTP-Pools festgestellt (s. Abb. 4.2). Das Nukleotid UTP ist besonders wichtig, da es nicht nur ein Substrat für die RNA-Polymerasen, sondern auch ein Substrat für die CTP-Synthase ist. Diese Reaktion ermöglicht die Synthese des Nukleotids CTP. In den meisten Organismen wird dieses Enzym durch eine leichte Erhöhung der CTP-Konzentration sehr effektiv inhibiert und durch UTP aktiviert (Endrizzi et al. 2005; Aronow und Ullman 1987). Eine mögliche Erklärung für den UTP-Verlust könnte also sein, dass das *Drosophila*-Homologe (CG45070) nicht durch

erhöhte CTP-Konzentrationen inhibiert werden kann. In den $D^m cN3B^{-/-}$ -Embryonen wurde eine durchschnittliche Erhöhung der CTP-Konzentration von 400 μM auf 690 μM festgestellt. Dass der Verlust der CTP-Inhibierung problematisch für die Balance des CTP/UTP-Pools ist, wurde in Aronow und Ullmann 1987 gezeigt. Hierfür benutzten die Experimentatoren eine murine T-Zell-Lymphoma-Zelllinie (S49-Zelllinie), die eine mutierte CTP-Synthase exprimiert. Dieses mutierte Enzym ist nur noch wenig sensitiv gegenüber einer erhöhten CTP-Konzentration. Wurden diese Zellen mit Actinomycin D oder Cycloheximid behandelt, stieg die zelluläre CTP-Konzentration währenddessen der UTP-Pool depletiert wurde. Wildtypzellen, die eine funktionale CTP-Synthase aufwiesen, zeigten keine Änderungen im CTP/UTP-Pool (Aronow und Ullman 1987). Ein Teil des UTPs kann außerdem durch die Verknüpfung mit Glukose durch eine Uridylyltransferase aus dem zellulären Nucleotidpool entfernt werden. Dies erklärt jedoch nicht, warum der zelluläre UTP-Pool in der $D^m cN3B$ -Nullmutante nicht wieder aufgefüllt wird.

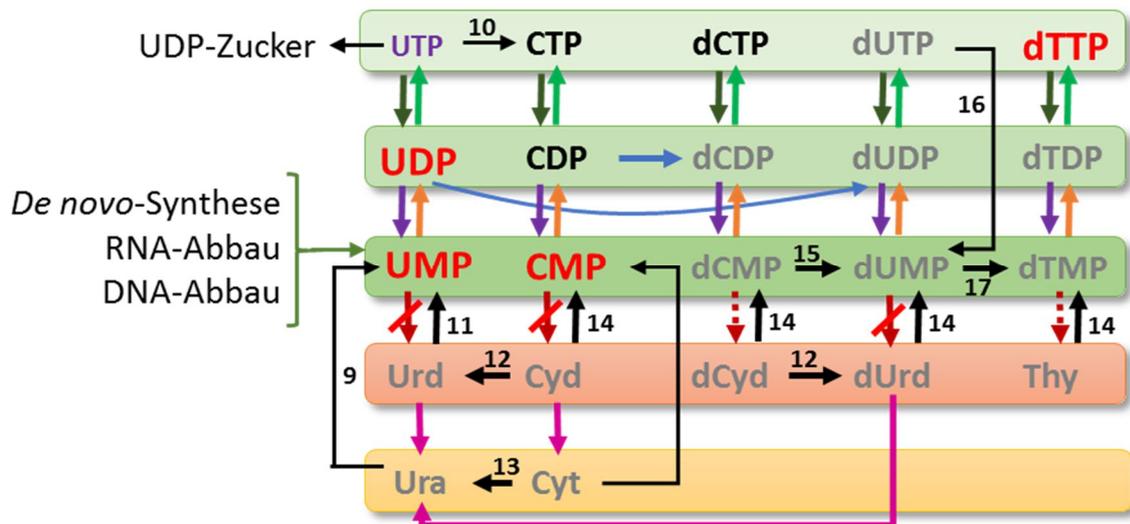


Abb. 4.2 Schematische Darstellung des Pyrimidinnucleotidmetabolismus bei einem $D^m cN3B$ -knockout in *D. melanogaster*. Rot hervorgehoben sind die Nucleotide, die signifikant angereichert wurden, während lila hervorgehoben signifikant abgereichert bedeutet. Grau eingefärbt sind die Nucleotide, Nucleoside und Nucleobasen, die durch keinen Assay in ihrer Abundanz gemessen worden sind. Die gestrichelten Pfeile bei der 5'-Nucleotidaseaktivität für 5'-dNMPs bedeuten, dass nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob diese Aktivität noch vorhanden ist. Insbesondere da in *D. melanogaster* kein homologes Enzym zur zytosolischen Deoxynucleotidnucleotidase gefunden wurde.

Die frühen Phasen der Embryogenese sind für den Nucleotidmetabolismus eine Herausforderung, da der Embryo viele DNA-Replikationszyklen durchläuft und somit

jederzeit optimale dNTP-Konzentrationen zur Verfügung stehen müssen. Außerdem findet zu dieser Zeit auch der Wechsel von maternalen zu zygotischen Transkripten statt, d.h. sowohl mRNA-Abbau als auch mRNA-Synthese müssen koordiniert werden. Das Nukleotid UDP ist nicht nur Ausgangspunkt für die UTP-Synthese, sondern auch ein Substrat für die Ribonukleotidreduktase. Das entstehende dUDP ist ein Vorläufermolekül für die dTTP-Synthese. Die signifikant erhöhte dTTP-Konzentration (Faktor 2,4) im Dm cN3B^{-/-}-Embryo kann damit durch den Überschuss an UDP erklärt werden (s. Abb. 4.2). Außerdem wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass die Dm cN3B in der Lage ist die Dephosphorylierung von 5'-dUMP zu katalysieren, einem weiteren dTTP-Vorläufermolekül. Ein Verlust der Dm cN3B-Aktivität würde somit die Synthese von dTTP an mehreren Stellen durch eine Akkumulation der Vorläufermoleküle vorantreiben. Bemerkenswert ist auch die generelle Erhöhung des gesamten Nukleotidpools durch den Dm cN3B-*knockout* (insgesamt fast 2 mM mehr Nukleotide), was wiederum den regulatorischen Einfluss der 5'-Nukleotidasen auf die Poolzusammensetzung verdeutlicht. Vergewahrtigt man sich, dass der Embryo zum Untersuchungszeitpunkt ein quasi abgeschlossenes System darstellt, lässt sich allein aus diesen Beobachtung schließen, dass die Dm cN3B einen regulatorischen Einfluss sowohl auf die 5'-NMP-Konzentration, als auch indirekt auf die Konzentration von NDPs, NTPs und dNTPs besitzt.

Die Transkripte der Dm cN2 waren in fast allen Geweben und zu jedem Entwicklungsstadium der Taufliege nachweisbar. Durch die sehr hohe Konservierung der Primärsequenz der cN2-Enzyme wurde eine generelle und möglicherweise essentielle Funktion vermutet (Itoh 2013). Überraschenderweise erwies sich jedoch ein genetischer *knockout* der Dm cN2 als wenig schwerwiegend. Wie erwartet, wurde zwar eine Akkumulation von 5'-GMP beobachtet, jedoch wurde kein Einfluss der Deletion auf die Entwicklung von *D. melanogaster* festgestellt. Unerwartet war die gemessene Reduktion an freiem 5'-IMP. Die Dm cN2 wies für die 5'-NMPs GMP und IMP die höchste katalytische Effizienz auf, daher hätte man also eine Akkumulation beider Substrate erwartet. Ein cN2-*knockout* in Hefe führte dort beispielsweise zu einem vierfachen Anstieg der 5'-IMP-Konzentration (Walther et al. 2010). Der 5'-IMP-Verlust in den

^{Dm}cN2^{-/-}-Embryonen lässt sich wahrscheinlich nur durch eine allosterische Regulation der Purinsyntheseenzyme erklären, die durch akkumulierendes 5'-GMP inhibiert werden können (z. B. die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase, Krahn 1996). Ein cN2-*knockdown* in Astrozytomazellen (auf 50%) aktivierte dort die Caspase 3 und führte zu vermehrten Zelltod, jedoch wurde auch in diesen Zellen keine Nukleotidpoolverschiebungen festgestellt (Careddu et al. 2008). Eine cN2-Reduktion führte in diesen Zellen nur zu einer leichten cN3-Transkripterhöhung, was auch in dieser Arbeit auf Proteinebene beobachtet wurde (s. 3.5.7). In anderen Zellen wurden durch eine cN2-Reduktion durch Behandlung mit siRNAs nur sehr schwache Effekte auf die Zellviabilität beobachtet (in A549-Zellen, Li et al. 2012). Außerdem wurde durch eine Reduktion der cN2-Transkriptmenge eine leichte Erhöhung der Ribonukleotidreduktase- und der HGPRT-Transkriptmenge festgestellt (Zabielska et al. 2015). Erstaunlicherweise findet sich in *D. melanogaster* keine HGPRT-Aktivität und durch Sequenzanalysen konnte auch kein Homologes zur humanen HGPRT gefunden werden (Becker 1978). Die HGPRT ist ein essentieller Teil des bereit beschriebenen Purin-Substratzykluses (s. 2.2.2). Es wurde lediglich ein Homologes zur humanen Adeninphosphoribosyltransferase identifiziert (CG18315, *aprt*, Johnson et al. 1987). Es ist nicht bekannt, ob dieses Enzym in der Lage ist auch Guanin und Hypoxanthin umzusetzen. Die Überführung von 5'-AMP zu 5'-IMP durch eine 5'-AMP-Deaminase ist normalerweise sinnvoll, da der Stoffwechsel eher auf Schwankungen in der 5'-AMP-Konzentration sensitiv reagiert. Durch die Umwandlung in 5'-IMP und die Einbindung in den Substratzyklus können Purinbausteine gespeichert werden, ohne dabei andere Stoffwechselwege zu beeinflussen. In der Taufliege scheint diese Regulation jedoch ohne eine entsprechende HGPRT-Aktivität nicht möglich. Eine Überexpression der cN2 sorgte in HEK293-Zellen für einen signifikant erniedrigten 5'-IMP-Spiegel, während 5'-GMP unverändert blieb (Cividini et al. 2015). Außerdem wurde unter diesen Bedingungen eine leichte Reduktion der GDP-Konzentration und der Konzentration aller Nukleosidtriphosphate beobachtet und eine leichte Akkumulation von 5'-AMP. Auch hier bewirkte also eine Manipulation der 5'-Nukleotidaseproteinmenge weitreichende Verschiebungen im Nukleotidpool. Die cN2-überexprimierenden Zellen

wiesen jedoch keine reduzierte Vitalität auf (Cividini et al. 2015). Vermutlich kann im *D. melanogaster*-Embryo der Verlust der $^{Dm}cN2$ gut mit der enzymatischen Aktivität der $^{Dm}cN3B$ kompensiert werden, da sie sich in ihrem Substratspektrum überschneiden.

In der *Flybase*-Datenbank (www.flybase.org) wurden in *D. melanogaster* nur elf verschiedene Proteine ausgemacht, die auf Grund von Homologien eine 5'-Nukleotidaseaktivität aufweisen könnten (s. A.1.II.1). Darunter befinden sich die in dieser Arbeit untersuchten zytosolischen 5'-Nukleotidasen *cN3B* und *cN2*, sowie mehrere Vertreter der ekto-solischen 5'-Nukleotidasefamilie (*NT5E2*, *veil*, CG11883). Die Transkripte dieser ekto-solischen 5'-Nukleotidasen wurden in der frühen Embryogenese nicht oder nur wenig detektiert (Fenckova et al. 2011). Inwieweit die Proteine tatsächlich exprimiert wurden, ist nicht bekannt, daher kann ein kompensatorischer Einfluss auf die Nukleotidkonzentrationen im zellulären Nukleotidpool im $^{Dm}cN3B^{-/-}$ - bzw. im $^{Dm}cN2^{-/-}$ -Embryo nicht ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die Transkriptexpression von Enzymen, die zur Nukleotidsynthese beitragen, mit denen, die am Nukleotidabbau beteiligt sind, liegen insbesondere in den frühen Phasen der *D. melanogaster*-Embryogenese (0-4 h) die Transkripte der Nukleotidsyntheseenzyme in großen Mengen vor während die Transkripte der nukleotidabbauenden Enzyme eher unterrepräsentiert bzw. nicht vorhanden sind (s. A.1.II.2). Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen *cN3B* und *cN2* weisen zu der Zeit jedoch eine moderate Menge an Transkripten auf, was einer rein katabolen Funktion in dieser frühen Phase der Embryogenese eher widerspricht. Die Phosphoribosyltransferasen und die Uracil-Phosphorylase weisen in dieser Zeit ebenfalls hohe Transkriptmengen auf. Auch dies legt eine regulatorische Funktion des 5'-NMP-Substratzyklus nahe. Erstaunlicherweise waren nur sehr wenige Transkripte der Purinnukleosidphosphorylase zwischen 0-4 h der Embryogenese nachweisbar. Da jedoch auch keine HGPRT-Aktivität in *D. melanogaster* nachweisbar war, ist der Mangel an Purinnukleosidphosphorylase-Transkripten nachvollziehbar, da ein Purin-Substratzyklus im klassischen Sinne ohne HGPRT-Aktivität nicht aufgebaut werden kann.

Abschließend kann gesagt werden, dass beide zytosolische 5'-Nukleotidasen die Konzentration des zellulären Nukleotidpools beeinflussen. Ihre Aktivität ist also nicht ausschließlich abbauender Natur, besonders nicht in den frühen Phasen der Embryogenese. Hier weist insbesondere die ^{Dm}cN3B eine regulatorische Funktion im Erhalt der Nukleotidpoolhomöostase auf. Die zytosolischen 5'-Nukleotidasen sind daher am ehesten als Teil des katabolen Arms des regulativ-wirksamen 5'-NMP-Substratzyklus zu begreifen.

4.5 Ursachen für die gestörte Embryogenese der ^{Dm}cN3B^{-/-}-Embryonen

Biologisch äußerte sich der *knockout* der ^{Dm}cN3B in Entwicklungsstörungen während der Embryogenese, der bei 37% der Embryonen zu einem embryonalen Arrest und somit zu einem Entwicklungsabbruch führte (s. 3.5.2). Durch Anfärbung dieser Embryonen mit DAPI wurde unverhältnismäßig wenig DNA-Material angefärbt und viele Kerne waren fragmentiert. Ältere Embryonen wiesen sogar kein durch DAPI nachweisbares Kernmaterial mehr auf. Außerdem war die Entwicklung der ^{Dm}cN3B^{-/-}-Embryonen fast um einen Tag verzögert im Vergleich zu Wildtypembryonen.

Die frühen Phasen der *D. melanogaster*-Embryogenese sind geprägt von 13 synchronen, sehr schnellen Kernteilungen, welche alle ohne Zellteilung stattfinden (Sullivan und Theurkauf 1995). Ein weiteres Charakteristikum dieser ersten Kernteilungen ist die Abwesenheit von *gap*-Phasen (G1- und G2-Phase) zwischen der Mitose und der S-Phase. Es werden dadurch Teilungsgeschwindigkeiten von einer Teilung pro 10 Minuten erreicht (Tram et al. 2001; Foe und Alberts 1983). Hierfür muss auch die DNA-Replikation innerhalb von kürzester Zeit vonstatten gehen. Derartig hohe Replikationsgeschwindigkeiten verhindern zu dieser Zeit klassische Reparaturmechanismen zur Sicherung der DNA-Qualität, d.h. eventuelle DNA-Schäden werden nicht repariert, sondern fehlerhafte Kerne werden abgebaut (*nuclear fallout mechanism*) (Pushpavalli et al. 2013; Takada et al. 2003; Kolonin und Finley 2000; Sullivan et al. 1993). Hierfür verantwortlich sind verschiedene Zellzyklus-*checkpoint*-Proteine (z.B. Grape und Checkpointkinase 2), die bei DNA-Schäden eine Verzögerung

des Anaphase zu Metaphase Übergangs bewirken, sodass die fehlerhaften Kerne im inneren des Embryos verbleiben und dort durch DNasen (in *D. melanogaster* durch dCAD/Rep4, Yokoyama et al. 2000) abgebaut werden (Royou et al. 2005; Takada et al. 2003; Sibon et al. 2000). Dies würde die fragmentierten Kerne in den $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Embryonen erklären.

Ein unausbalancierter dNTP-Pool kann die Mutagenese- und Rekombinationsrate erhöhen und dadurch zu Schäden an der DNA führen (Poli et al. 2012; López et al. 2009; Steller 2008; Mathews 2006; Darè et al. 1995; Kunz et al. 1994). Die zelluläre Konzentration der dNTPs wird daher meist sowohl allosterisch als auch genetisch streng kontrolliert (Håkansson et al. 2006). Durch ein Ungleichgewicht im dNTP-Pool kann es zu Fehlpaarungen während der DNA-Replikation kommen, die dann zu Strangbrüchen, Deletionen, Insertionen und Leserahmenverschiebungen führen (Kumar et al. 2011; Kunkel 2004; Kunz et al. 1994). Durch eine Mutation der Ribonukleotidreduktase in *S. cerevisiae* wurde beispielsweise ein um Faktor drei erhöhtes dTTP-Level erreicht, was eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate (Basenaustausche) der Hefen um Faktor 2,8 bewirkte (Kumar et al. 2011). Der in dieser Arbeit festgestellte signifikante Anstieg der dTTP-Konzentration um Faktor 2,4 wäre also ausreichend, die Integrität der DNA zu gefährden indem die hohe dTTP-Konzentration Fehlpaarungen während der DNA-Replikation bewirkt, die wiederum zu Mutationen und DNA-Schäden führen. Für diese Theorie würde auch der generelle Anstieg an Desoxynukleotiden im $^{Dm}cN3B^{-/-}$ -Embryo sprechen, denn es wurde bereits gezeigt, dass DNA-Schäden verschiedener Art in *S. cerevisiae* zu einem generell erhöhten dNTP-Pool führen (Chabes et al. 2003). Diese Beobachtung kann vermutlich durch die bei DNA-Schäden erhöhte Expression der Ribonukleotidreduktase erklärt werden, die einen globalen dNTP-Anstieg nach sich zieht (Gon et al. 2011).

Dass der Verlust der cN3B auch einen Einfluss auf den Zellzyklus zu haben scheint, zeigte ein großes siRNA-Screening in S2-Zellen (embryonale *Drosophila*-Zelllinie) mit dem Transkripte identifiziert wurden, die einen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf haben (Björklund et al. 2006). Eine siRNA gegen das cN3B-Transkript führte hier zu einer Akkumulation der S2-Zellen in der G2-Phase. Auch ein cN3-*knockdown* in *C.*

elegans (wormbase.org; Y10G11A.1) sorgte für einen lethalen Phänotyp auf embryonaler Ebene und auffallender nukleärer Morphologie im frühen Embryo (es wurden keine Kerne detektiert, Galy et al. 2003). Dieser Phänotyp kann aber nicht eindeutig auf das cN3-Transkript zurückgeführt werden, da das primäre Ziel des siRNA-vermittelten *knockdowns* das Transkript des Nukleoporins npp-20 (Y77E11A.13a) war.

Neben dem Verlust der katalytischen Aktivität der ^{Dm}cN3B, könnte auch der Mangel an ^{Dm}cN3B als Protein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Dies legt eine *next generation*-Proteininteraktionsstudie in HeLa-Zellen nahe, bei dem die Interaktionspartner von 1125 GFP-fusionierten Proteinen untersucht wurden (Hein et al. 2015). Hierbei wurde die humane cN3 mit fünf verschiedenen Proteinen in Verbindung gebracht: MZT1 (*mitotic spindle organising*-Protein), CENPE (Centromerprotein E), Mis12 (Kinetochorprotein), CDC42 (GTPase, Hauptregulator des Aktinskeletts) und SESN2 (Sestrin 2). Überraschend waren die drei an der Ausbildung des Spindelapparates beteiligten Proteine MZT1, CENPE und Mis12, die alle drei in *D. melanogaster* konserviert sind (Schmit et al. 2015; Venkei et al. 2011; Yucel et al. 2000). Eventuell ist also der Verlust der ^{Dm}cN3B als Interaktionspartner für diese Proteine verantwortlich für eine fehlerhafte Kernteilung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ursache für den beobachteten Phänotyp bei einem ^{Dm}cN3B-*knockout* nicht eindeutig identifiziert. Mögliche Ursachen wären die Akkumulation von m⁷GMP (ein konsequenter Einbau in DNA ist jedoch eher unwahrscheinlich, da bereits kein Einbau in RNA nachgewiesen werden konnte), die Veränderungen im zellulären Nucleotidpool (die erhöhte dTTP-Konzentration führt zu DNA-Schäden) oder der Verlust der ^{Dm}cN3B als Interaktionspartner für Spindelapparat-assoziierte Proteine (fehlerhafte Kernteilung). Möglicherweise wird der Phänotyp aber auch durch die Summe aller Effekte verursacht. Hierfür würde zumindest die Vielgestaltigkeit der defekten Embryonen sprechen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene zytosolische 5'-Nukleotidasen aus *D. melanogaster* und *H. sapiens* untersucht. Ausgangspunkt war die Identifizierung einer neuartigen 5'-Nukleotidase (^{Dm}cN3B) in *D. melanogaster*, die spezifisch die Dephosphorylierung von m⁷GMP katalysieren konnte, einem Abbauprodukt der mRNA-5'-cap-Struktur. Das rekombinante Enzym setzte bevorzugt m⁷GMP um, jedoch waren besonders auch die 5'-Pyrimidinmonophosphate CMP und UMP gute Substrate. Im Menschen wurden zu diesem Enzym zwei Homologe gefunden: die cN3A und die cN3B. Die cN3A ist als pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase bereits in zahlreichen Studien untersucht worden. Dennoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch dieses Enzym in der Lage ist m⁷GMP effizient zu dephosphorylieren. Die humane cN3B wurde bis jetzt noch nicht näher charakterisiert, wies aber größere Primärsequenzhomologie zur ^{Dm}cN3B als die ^{Hs}cN3A auf. Tatsächlich konnte bestätigt werden, dass die ^{Hs}cN3B den niedrigsten K_M-Wert für das Substrat m⁷GMP aufwies, aber ebenfalls eine eindeutige Pyrimidinspezifität besitzt. Die purinspezifischen 5'-Nukleotidasen (^{Dm}cN2 und ^{Hs}cN2) zeigten überraschenderweise wenig katalytische Aktivität gegenüber m⁷GMP, obwohl es sich hierbei um ein Purinnukleotid handelt. Die ^{Dm}cN2 wurde in dieser Arbeit erstmalig charakterisiert, reiht sich aber mit ihren katalytischen Eigenschaften gut in die bereits bekannten Daten zu cN2-Enzymen anderer Organismen ein. Die ungewöhnliche Affinität der cN3-Enzyme für ein methyliertes Purinnukleotid wurde durch Kristallstrukturanalysen der ^{Dm}cN3B erklärbar. Sowohl m⁷GMP als auch 5'-CMP werden in der ^{Dm}cN3B in einem hydrophoben Käfig koordiniert. Die Präferenz für das Substrat m⁷GMP wird durch dessen Methylierung verursacht, die eine positive Ladung im Guaninring erzeugt, die für eine zusätzliche Coulomb-Wechselwirkung mit den umgebenden aromatischen Aminosäureseitenketten sorgt. Der gewählte Modellorganismus *D. melanogaster* bietet die Möglichkeit die zytosolischen 5'-Nukleotidasen cN3B und cN2 gezielt auf genetischer Ebene zu deletieren. Dies sollte die Frage nach der eigentlichen Funktion der zytosolischen 5'-Nukleotidasen beantworten, die bis jetzt noch nicht klar definiert werden konnte. Hierbei stehen sich eine rein katabole als auch eine regulatorische

Funktion gegenüber. Der *knockout* der Dm cN3B führte zu einem semilethalen embryonalen Arrest-Phänotyp mit auffälligen Kernstrukturen in frühen Embryonen. Die Dm cN3B^{-/-}-Embryonen wiesen außerdem eine stark reduzierte m⁷GMP-dephosphorylierende Aktivität auf, zeigten weitreichende Veränderungen im zellulären Nukleotid-Pool und besaßen ein Ungleichgewicht im dNTP-Pool. Zusammen mit Transkriptexpressionsanalysen zu Enzymen die am Nukleotidstoffwechsel beteiligt sind, kann der Dm cN3B in den frühen Phase der *D. melanogaster*-Embryogenese klar eine regulative Funktion im Erhalt der Nukleotidpoolhomöostase zu geordnet werden. Ein *knockout* der Dm cN2 war weniger schwerwiegend, so waren die Dm cN2^{-/-}-Embryonen morphologisch unauffällig und wiesen auch nur leichte Nukleotidpool-Verschiebungen auf, die sich jedoch auf 5'-NMPs beschränkten. Da der Dm cN2-*knockout* eine Erhöhung der Dm cN3B-Expression verursachte, ist eine kompensatorische Wirkung der Dm cN3B in Dm cN2^{-/-}-Embryonen sehr wahrscheinlich, besonders da sich die beiden Enzyme in ihrem Substratspektrum überschneiden.

Der beobachtete Phänotyp in den Dm cN3B^{-/-}-Embryonen führt zu einer Reihe interessanter Fragen und Bedarf weiterer Aufklärung. Ob in den arretierten Embryonen vermehrt DNA-Schäden durch den fehlerhaften Einbau von dTTP auftreten, kann direkt durch einen TUNEL- (*terminal desoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling*)-Assay untersucht werden. Der TUNEL-Assay markiert die durch Abbau entstehenden DNA-Enden mit Fluorescein-gekoppeltem dUTP. Diese Markierung ist dann direkt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops in Embryonen nachweisbar. Außerdem kann durch Immunfluoreszenz-Färbungen der Embryonen eine Akkumulation bestimmter *checkpoint*-Markerproteine untersucht werden, die Rückschlüsse auf DNA-Schäden oder eine Arretierung in bestimmten Zellzyklusphasen zu lassen. Auch eine Färbung des Spindelapparates mit Hilfe eines α -Tubulin-Antikörpers, bzw. der Centromere mit einem Centrosomin-Antikörper könnte Aufschluss über den Einfluss der Dm cN3B auf die Kernteilung geben. Hierfür wäre auch ein Protein-Pulldown-Experiment interessant, mit dessen Hilfe mögliche Interaktionspartner der Dm cN3B identifiziert bzw. bestätigt werden könnten. Unumgänglich ist außerdem ein sogenannter *rescue* der Dm cN3B^{-/-}-Embryonen, indem

das ^{Dm}*cn3b*-Gen wieder über Rekombination in den Deletionshintergrund eingebracht wird. Dabei wäre es insbesondere interessant eine katalytisch inaktive Variante einzubringen, um zu untersuchen, ob die Aktivität oder das Protein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Da es in *D. melanogaster* nur zwei der zytosolischen 5'-Nukleotidasen gibt, bietet dieser Organismus die einmalige Gelegenheit beide Enzyme gleichzeitig auf genetischer Ebene zu deletieren. Die Charakterisierung dieser Doppelmutante ermöglicht es u.a. weitreichendere Funktionen der ^{Dm}cN2 zu identifizieren, sowie die Auswirkungen eines vollständigen 5'-Nukleotidaseverlustes auf den Nukleotidmetabolismus zu studieren.

5 Material und Methoden

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen von Green und Sambrook 2012 durchgeführt. Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von Merck, Roth oder Sigma Aldrich bezogen. Enzyme und verwendete Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

5.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Die Stämme wurden vor ihrer Verwendung durch Ausstreichen auf entsprechendem antibiotikahaltigem Medium verifiziert.

Stamm	Genotyp	Firma
BL21 (DE3) CodonPlus	B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal(DE3), [codon+]	Stratagene
Rosetta2	F ⁻ , dcm, ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, pRARE2 (Cam ^R)	Novagen
XI1-Blue	K12, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac ⁻ , F ⁻ , proAB, lacIqZM15, Tn10(Tet ^R)	Stratagene

5.2 Verwendete Fliegenstämme

Stamm	Genotyp	Deletionsmethode
Wildtyp	Canton S N5	-
^{Dm} cN3B ^{-/-}	w ¹¹¹⁸ ; CG3362 ^{minus} /CyO; +/+	piggyBac
cN3B ^{e01109}	w ¹¹¹⁸ ; PBac{RB}cN3B ^{e01109} /CyO; +/+	-
cN3B ^{f08086}	w ¹¹¹⁸ ; PBac{WH}cN3B ^{f08086} /CyO; +/+	-
^{Dm} cN2 ^{-/-}	γ ² cho ² v ¹ CG32549 ^{XS} ; +/+; +/+	CRISPR-Cas9

5.3 Zellkultivierung

5.3.1 Kultivierung von Schneider 2-Drosophila-Zellen

Schneider 2 (S2)-Zellen entstammen einer 20-24 h alten Primärkultur von *Drosophila melanogaster*-Embryonenzellen (Schneider 1972). Die Anzucht der S2-Zellen erfolgte in

Zellkulturflaschen (75 cm³) bei 25°C in *Schneider's Insect-Medium* (Invitrogen). Das Medium wurde mit 1%iger (v/v) Antibiotika/Antimykotika-Mischung (Gibco) und 10%igem (v/v) hitzeinaktiviertem, fetalen Kälberserum (Biochrom) komplementiert. Die semiadherent wachsenden S2-Zellen wurden alle vier Tage in frischem Medium auf 1•10⁶ Zellen/mL verdünnt. Hierfür wurden die S2-Zellen mechanisch vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Lebendzellzahl wurde über Färbung mit einer Trypanblaulösung (1:10 Mischung Zellsuspension: Färbelösung) und anschließender Auszählung der nicht blau gefärbten Zellen in einer Zählkammer nach Thoma bestimmt. Für die RNA-Extraktion wurden 250 µL einer Zellsuspension mit 1•10⁷ Zellen/mL direkt verwendet. Für die Zellernte wurden die S2-Zellen ebenfalls in Suspension gebracht und anschließend bei 500•g für zweimal 15 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810R). Das Zellpellet wurde mit 1xPBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Ein Zellaufschluss erfolgte mittels *cell lysis*-Puffers (Promega nach Herstellerangaben) und die Proteinkonzentration des Lysates wurde nach Bradford (Roth) bestimmt (s. 5.5.3).

1xPBS: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, 140 mM NaCl; pH 7,4

Trypanblaulösung: 0,4% (w/v) Trypanblau in 1xPBS

5.3.2 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Transformierte *E. coli*-Zellen wurden standardmäßig in antibiotikahaltigem LB (Luria Bertani)-Medium bei 37°C kultiviert. Zur Isolierung von Einzelklonen erfolgte ein Ausstrich auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten, währenddessen Flüssigkulturen in einem orbitalen Schüttler (200 rpm, 37°C) kultiviert wurden. Ernte und Aufschluss der *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte je nach Anwendung. Für die DNA-Gewinnung wurden kommerzielle Kits nach Herstellerangaben verwendet (Miniprep Kit I (Peqlab), Midiprep Kit (Qiagen)).

LB-Medium: 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 0,5 g/L NaCl in bidest. Wasser

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 RNA-Isolation

Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellmaterial erfolgte nach der *single step*-Methode mit Guanidiniumthiocyanat und Phenol (Trizol®, nach *life technologies*). Hierfür wurden die verwendeten Zellen (250 µL mit $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL) direkt mit 750 µL Trizol® aufgeschlossen und die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Die isolierte RNA wurde nach Standardprotokollen gereinigt und in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser aufgenommen (Green und Sambrook 2012). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 10 U DNaseI (Roche) für 1 h bei 37°C. Nach Hitzeinaktivierung der DNaseI wurde die RNA erneut gereinigt und in DEPC-Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde über Absorption (U3000 Spektrophotometer, Hitachi) bestimmt. RNA für die Amplifikation von *D. melanogaster*-Transkripten wurde aus Schneider 2-Zellen gewonnen. Für humane Transkripte wurde die RNA aus HEK293-Zellen oder U2OS-Zellen isoliert, die freundlicherweise von Dr. Christiane Rammelt und Dr. Claudia Weißbach zur Verfügung gestellt wurden.

Trizol: 38% (v/v) wassergesättigtes Phenol; 0,8 M Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat pH 5,3; 5% (w/v) Glycerin in DEPC-Wasser

DEPC-Wasser 0,1% DEPC in Wasser, autoklaviert

5.4.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Die cDNA der zu amplifizierenden Transkripte wurde durch reverse Transkription (RT) der isolierten RNA mit der *Moloney murine leukemia virus* (MMLV) reversen Transkriptase (Promega) generiert. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden entweder transkriptspezifische Oligodesoxynukleotide (Inkubationstemperatur 42°C) oder ein dT12-Oligodesoxynukleotid (Inkubationstemperatur 37°C) verwendet (s. A.1.II.3). Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die durch die RT-Reaktion erzeugten cDNAs amplifiziert. Für die PCR wurde je nach Bedarf entweder Pfu (*Pyrococcus furiosus*, Fermentas), Pwo (*Pyrococcus woesei*, Peqlab) oder Taq (*Thermophilus aquaticus*, Promega) Polymerase eingesetzt und diese

nach Herstellerangaben verwendet. Für die Amplifikation der 5'-Nukleotidase-cDNAs wurden spezifische Oligodesoxynukleotidpaare verwendet, die außerdem die Erkennungssequenz der für die Klonierung benötigten Restriktionsenzyme einführen (s. A.1.II.3). Bei Schwierigkeiten mit der Produktamplifikation wurde die *annealing*-Temperatur moduliert, bzw. schrittweise während der Reaktion erniedrigt (*touchdown*-PCR), oder die Magnesium-Konzentration im Ansatz variiert (1 bis 4 mM). In seltenen Fällen wurde auch Dimethylsulfoxid (DMSO; zwischen 2-10% (v/v); Jensen et al. 2010), bzw. Spermidin (bis 1 mM) zugesetzt. Beide Substanzen helfen GC-reiche DNA-Bereiche aufzuschmelzen. Die Qualität der PCR-Produkte wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Green und Sambrook 2012). Die cDNA-Produkte wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz mit einem kommerziellen PCR *purification* Kit (Roche) gereinigt oder durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel gereinigt (*Gel extraction* Kit, Qiagen oder *squeeze&freeze* Methode, Tautz und Renz 1983). Die DNA-Konzentration wurde durch Absorption bestimmt (U3000 Spektrophotometer, Hitachi).

5.4.3 Klonierung

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (NEB) nach Herstellerangaben inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurde die geschnittene cDNA durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt. Anschließend wurde die cDNA mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK, NEB) nach Herstellerangaben inkubiert. Die cDNA der 5'-Nukleotidasen wurde in einen pET-SUMOadapt-Vektor, einen Expressionsvektor, kloniert (Bosse-Doenecke et al. 2008). Der Vektor wurde zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, gereinigt und mit der alkalischen Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, CIP, NEB) bei 37°C für 1 Stunde dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Dieser Expressionsvektor enthält direkt 3' seiner T7-Promotorsequenz zusätzlich die DNA-Sequenzen für ein Polyhistidinpeptid und das SUMO (*small ubiquitin like modifier*)-Protein. Die cDNA wurde direkt 3' von der SUMO-DNA-Sequenz im Leseraster eingebracht. Die Ligationsreaktion wurde mit

T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktion wurde zusätzlich noch frisches ATP (2 mM) und DTT (1 mM) zugesetzt. Die Inkubation wurde entweder eine Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde dann durch Elektroporation in XL1blue-*E.coli*-Zellen eingebracht, und die so transformierten *E. coli*-Zellen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden anschließend vereinzelt, vermehrt und die Plasmid-DNA mit Hilfe eines MINI-Prep Kits (peqGOLD, Peqlab) isoliert. Der Erfolg der Klonierung wurde entweder durch Restriktionsverdau oder PCR überprüft. Die Sequenzidentität wurde durch DNA-Sequenzierung validiert (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). Später wurde die Sequenzierung kommerziell durchgeführt (Firma Eurofins MWG Operon). Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Seqman® (DNASTar Software). In Tabelle 5.1 wurden alle klonierten Konstrukte mit den jeweils verwendeten Restriktionsenzymen aufgelistet.

Tab. 5.1 Dargestellte 5'-Nukleotidase-Konstrukte.

Klon	Plasmid	Restriktionsenzyme	Isoform
^{Dm} cN2	pETSUMOadapt	5': Bsal 3': HindIII	Isoform B
^{Dm} cN3B	pETSUMOadapt	5': Bsal 3': XhoI	Isoform 1
^{Hs} cN2	pETSUMOadapt	5': Bsal 3': HindIII	Isoform 2
^{Hs} cN3A	pETSUMOadapt	5': Bsal 3': XhoI	Isoform 3
^{Hs} cN3B	pETSUMOadapt	5': Bsal 3': XhoI	Isoform 1

5.4.4 Die cDNA-Generierung von CG32549

Zur Generierung der cDNA von CG32549 wurde eine RT-PCR auf isolierte RNA von S2-Zellen, sowie von *D. melanogaster*-Embryonen durchgeführt. Trotz mannigfaltiger Variation der Reaktionsbedingungen war es nicht möglich, die cDNA direkt zu amplifizieren und es wurde daher ein cDNA-Klon der Berkely *Drosophila Genome Project*-Bibliothek gekauft (pOT2-CG32549; Isoform E; GH28326). Zur annotierten Isoform B, die die höchste Ähnlichkeit zur humanen cN2 aufwies, fehlten noch 290 Basenpaare am 5'-Ende. Daher wurde zunächst die erhaltene cDNA über PCR so amplifiziert, dass am 5'-Ende 20 Nukleotide der fehlenden Sequenz zur Isoform B

angebracht wurden (als *linker*-Sequenz) und am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII* (1597 Basenpaare lang; 3'-Fragment). Das fehlende 5'-Ende zur Isoform B wurde kommerziell synthetisiert (Eurofins MWG Operon, 293 Basenpaare; 5'-Fragment), so dass das 3'-Ende komplementär zur *linker*-Sequenz des 3'-Fragments ist. Die 5'- und 3'-Fragmente wurden gelgereinigt, gleiche Stoffmengen miteinander hybridisiert und die vollständige CG32549-cDNA mittels PCR amplifiziert.

5.4.5 Mutagenesereaktion

Um Mutationen in die Expressionsplasmide von ^{Dm}cN3B und ^{Hs}cN3A bzw. ^{Hs}cN3B einzuführen wurde eine ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange® Protokoll (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Oligodesoxynukleotidpaare wurden im Anhang in Tab. A.1.II.4 zusammengestellt. Die mutierte Plasmid-DNA wurde in elektrokompetente XL1blue-*E.coli*-Zellen transformiert und Einzelklone durch Ausstreichen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten erhalten. Nach Vermehrung der Einzelklone und Plasmidisolation wurde der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung und gegebenenfalls durch Restriktionsverdau überprüft.

5.5 Proteinchemische Methoden

5.5.1 Expression und Aufschluss

Für die Expression der 5'-Nukleotidasen wurden Rosetta 2-*E. coli*-Zellen verwendet. Nach Elektrottransformation mit dem entsprechenden Expressionsplasmid erfolgte die Anzucht über Nacht bei 37°C auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellkolonien mit einem Zellschaber geerntet und in 3 mL LB-Medium resuspendiert. Standardmäßig wurden je zwei 2 L-Schüttelkolben mit je 500 mL antibiotikahaltigem Medium mit gleichen Volumina an Suspensionslösung inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 200•rpm in einem horizontalen Schüttler bis eine optische Dichte (OD bei 600 nm) zwischen 0,7 bis 1 erreicht wurde. Die Expression wurde dann durch Zugabe von je 500 mL eiskaltem Medium, welches 2

mM IPTG (finale Konzentration 1 mM) enthielt, induziert. Dadurch wurde die Temperatur der Expressionskultur sofort auf ca. 16°C gesenkt. Anschließend wurde die Expressionskultur gleichmäßig auf vier 2 L- Schüttelkolben verteilt. Die Expressionsbedingungen variierten in Abhängigkeit des zu exprimierenden Proteins und wurden daher in Tab. A.1.II.5 zusammengefasst. Von der Expressionskultur wurde jeweils eine Probe vor Induktionsstart und nach Beendigung der Expression genommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 90°C erhitzt und für eine spätere Analyse bei -20°C aufbewahrt. Die Expressionskulturen wurden nach Beendigung der Expression auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4000•g für 15 Minuten und 4°C geerntet (Beckmann-Zentrifuge, JA 16.50 Rotor). Die Zellpellets wurden in eiskaltem Lysepuffer (3-4faches Pelletvolumen) resuspendiert. Das Lysat wurde dann mit Lysozym (10 mg/mL Lysat), DNase I (5 mg/mL Lysat) und PMSF (0,8 mg/mL Lysat) versetzt und für eine Stunde bei 8°C inkubiert. Für den Zellaufschluss wurde standardmäßig eine French press (French-Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc.) verwendet. Das Homogenisat wurde dann eine Stunde lang bei 30000•g und 4°C zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, JLA 25.50 Rotor).

Lysepuffer
^{Dm}cN3B, ^{Dm}cN2
und ^{Hs}cN3B: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 20 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, 400 mM KCl, 10% (w/v) Glycerin, 20°C

Lysepuffer
^{Hs}cN3A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6, 20 mM Imidazol, 500 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5% (w/v) Glycerin

Lysepuffer
^{Hs}cN2: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, 10 mM Imidazol, 500 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10% (w/v) Glycerin

5.5.2 Proteinreinigung

Für die Proteinreinigung aus großen Expressionskulturen wurde ein Pharmacia FPLC (*fast protein liquid chromatography*)-System verwendet, das fest in einem Kühlschrank (10°C) installiert war. Dies ermöglichte eine reproduzierbare Reinigung über selbstgepackte Säulen (Leersäule, Pharmacia; Materialien: Nickel-NTA-Agarose (Qiagen), Hydroxyapatit (Biorad), oder kommerziell erworbene Säulen (Superdex 200 (Pharmacia), MonoQ-Sepharose (GE Healthcare), Heparin-Sepharose (GE Healthcare)). Während der Reinigung wurden die Absorption bei 280 nm und die Leitfähigkeit

aufgezeichnet. Außerdem wurde die Fraktionierung des Eluates nach Vorgaben eines selbstgeschriebenen Reinigungsprogramms automatisiert. Kleinere Expressionsansätze wurden im sogenannten *batch*-Verfahren gereinigt, d.h. das Lysat wurde mit der Matrix inkubiert und dann in eine Leersäule überführt. Die Reinigung erfolgt hierbei allein durch den Gravitationsdruck, jedoch analog zum FPLC-System mit Durchfluss, Waschschritten und einer schrittweisen Elution. Standardmäßig wurden die Fraktionen einer Proteinreinigung mittels SDS-PAGE nach Laemmli und anschließender Coomassie-Färbung qualitativ analysiert. Wenn möglich wurde außerdem die Enzymaktivität der Fraktionen bestimmt.

5.5.2.1 Reinigung durch Nickel-NTA-Chromatographie

Die Expression der 5'-Nukleotidasen als His₆-SUMO-Fusionsproteine ermöglichte eine spezifische Bindung dieser Proteine an eine Nickel-NTA-Agarosematrix (Qiagen) durch die Polyhistidinsequenz. Standardmäßig wurde das geklärte Zelllysate (ca. 40 mL) mit Hilfe eines Superloops auf eine selbstgepackte, in Waschpuffer äquilibrierte Nickel-NTA-Agarosesäule (5 mL) geladen. Die Durchflussfraktion wurde gesammelt und die beladene Säule anschließend mit mindestens 5 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, solange bis die Absorption bei 280 nm konstant bei null lag. Die Waschfraktionen wurden gesammelt. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 100% Elutionspuffer. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min und die Elution erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 mL. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,75 mL gesammelt.

Bei kleineren Expressionsansätzen wurden 800 µL der Nickel-NTA-Agarosesuspension dreimal mit 4 mL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das geklärte Zelllysate (ca. 10 mL) mit der äquilibrierten Nickel-NTA-Matrix für zwei Stunden bei 8°C inkubiert. Die Lysat/Matrix-Suspension wurde dann in eine Biospin-Leersäule überführt und erneut dreimal mit 4 mL des Waschpuffers gewaschen. Die resultierenden Durchfluss- und Waschfraktionen wurden für spätere Analysen auf Eis aufbewahrt. Die Elution der an die Nickel-NTA-Agarose gebundenen Proteine erfolgte schrittweise mit ansteigendem Imidazolgehalt im Waschpuffer (20, 50, 200 und 500 mM Imidazol). Jeder Elutionsschritt wurde zweimal mit je 500 µL des entsprechenden Elutionspuffers

wiederholt. Die gesammelten Fraktionen wurden über SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert (s. A.1.1.3).

Anschließend wurden nur die Fraktionen vereinigt, die das Zielprotein in relevanten Mengen enthielten. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Waschpuffer (5•400 mL) bei 0°C dialysiert (Dialyseschlauch 16 mm, Ausschlussmolekulargewicht von 10-14 kDa, Visking Serva), um überschüssiges Imidazol zu entfernen. Zeitgleich wurde der Proteinlösung 2 mM DTT und 0,5 mM EDTA, sowie Ulp1-Protease (1 µg/mL Dialysat) beigemischt. Die Ulp1-Protease wurde nach dem Expressions- und Reinigungsprotokoll von Mossessova und Lima 2000 präpariert (Mossessova und Lima 2000). Die Protease katalysiert die Abspaltung des His₆-SUMO-Peptides in dem sie die Struktur des SUMO-Peptides erkennt. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (s. A.1.1.4). Das Dialysat wurde erneut einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen. Das zu reinigende Protein besaß nach der Abspaltung des His₆-SUMO-Peptides keine Polyhistidinsequenz mehr und wurde nicht mehr an die Matrix gebunden, sondern befand sich nun in der Durchflussfraktion. Das abgespaltene His₆-SUMO-Peptid, sowie die Ulp1-Protease, wurden über ihre Polyhistidinsequenzen an die Nickel-NTA-Agarosematrix gebunden und damit vom Zielprotein getrennt. Auch ein Großteil der restlichen Verunreinigungen der ersten Nickel-NTA-Chromatographie wurde über diesen Schritt entfernt (s. A.1.1.4).

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 20 mM Imidazol, 3 mM MgCl₂, 400 mM KCl, 10% (w/v) Glycerin, 20°C

Waschpuffer ^{H_s}cN3A 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6, 20 mM Imidazol, 500 mM KCl, 2 mM
und ^{D_m}cN2: MgCl₂, 10% (w/v) Saccharose

Elutionspuffer: Wie Waschpuffer mit 500 mM Imidazol

5.5.2.2 Reinigung durch Hydroxyapatitchromatographie

Für die weitere Reinigung der ^{D_m}cN3B, ihrer Mutationsvarianten und der ^{H_s}cN3B wurde der Durchfluss der zweiten Nickel-NTA-Chromatographie standardmäßig weiter über Hydroxyapatitchromatographie gereinigt. Hydroxyapatit besteht aus sphärischen Partikeln aus hydroxyliertem Calciumphosphat. Saure Proteine, wie beispielsweise ^{D_m}cN3B (pI 5,1) binden hierbei hauptsächlich mit ihren Carboxylgruppen an die C (Ca²⁺)-Stellen dieser Partikel und können durch ansteigende Phosphatkonzentrationen

wieder eluiert werden (Kandori et al. 2004). Die Durchflussfraktion der zweiten Nickel-NTA-Chromatographie wurde zunächst mit Puffer A 1:2 verdünnt, um die Magnesiumkonzentration zu halbieren. Eine selbstgepackte Hydroxyapatit-Säule (1 mL) wurde mit dem verdünnten Dialysat beladen, mit Puffer A gewaschen und an die Säule gebundene Proteine graduell mit Puffer B eluiert. Die Flussrate betrug 0,1 mL/min und es wurde mit einem Gesamtvolumen von 5 mL eluiert. Es wurden 0,25 mL Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt, die akzeptable Mengen an gereinigtem Protein enthielten und keine offensichtlichen Verunreinigungen mehr aufwiesen (s. A.1.1.5.A). Da der verwendete Aktivitätsassay für die zytosolischen 5'-Nukleotidasen sehr sensitiv gegenüber Phosphationen ist, wurden die vereinigten Fraktionen gegen Enzympuffer dialysiert (5•400 mL). Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der vereinten Fraktionen, die Aliquotierung und Schockfrost in Flüssigstickstoff. Die Aliquots wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

Puffer A: 20 mM Imidazol pH 7,5, 200 mM KCl, 5% (w/v) Glycerin, 20°C

Puffer B: 0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5

Enzympuffer: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) Glycerin, 20°C

5.5.2.3 Reinigung durch MonoQ-Chromatographie

Die ^{Dm}cN2 wurde nach der zweiten Ni-NTA-Chromatographie (nach Abtrennung des His₆-SUMO-Peptides) weiter über MonoQ-Sepharose fraktioniert. Die Durchflussfraktion der zweiten Ni-NTA-Chromatographie, die die ^{Dm}cN2 (insg. 5 mL) enthielt, wurde zunächst mit 5 mL niedrig Salz-Puffer gemischt und anschließend auf eine 1 mL MonoQ-Sepharose-Säule geladen und der Durchfluss gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit Puffer A gewaschen, solange bis die Absorption bei 280 nm konstant bei null lag. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 100% Puffer B. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min und die Elution erfolgte in einem Gesamtvolumen von 15 mL. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL gesammelt und diese zusammen mit der Durchflussfraktion mittels SDS-PAGE analysiert. In der Durchflussfraktion wurde keine Proteinbande bei der für die ^{Dm}cN2

erwarteten Größe von 60 kDa detektiert. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt, die akzeptable Mengen an gereinigtem Protein enthielten. Diese Fraktionen wurden anschließend weiter durch Hydroxyapatitchromatographie fraktioniert (s. 5.5.2.2).

Puffer A: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) Glycerin, 20°C

Puffer B: Puffer A mit 1 M KCl

Niedrig Salz-Puffer: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) Glycerin, 20°C

5.5.2.4 Reinigung durch Heparin-Sepharosechromatographie

Die ^{Hs}cN3A wurde nach der zweiten Ni-NTA-Chromatographie (nach Abtrennung des His₆-SUMO-Peptides) weiter über Heparin-Sepharose fraktioniert. Die Durchflussfraktion der zweiten Ni-NTA-Chromatographie, die die ^{Hs}cN3A (insg. 5,5 mL) enthielt, wurde auf eine 5 mL Heparin-Säule geladen und der Durchfluss gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit Puffer A gewaschen und die Elution erfolgte durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 50% Puffer B. Die Flussrate betrug dabei 0,3 mL/min und es wurde in einem Gesamtvolumen von 25 mL eluiert. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 0,75 mL. Es wurden die Fraktionen vereinigt, die akzeptable Mengen an gereinigtem Protein enthielten. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Enzympuffer dialysiert (5•400 mL) und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Die enzymhaltige Lösung wurde aliquotiert, die Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefrostet und diese bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

Puffer A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 75 mM KCl, 10% (w/v) Saccharose

Puffer B: Puffer A mit 2 M KCl

Enzympuffer: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 150 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10% (w/v) Saccharose,

5.5.2.5 Gelfiltrationschromatographie mit Sephacryl 200

Das native Molekulargewicht der ^{Dm}cN2 wurde durch Gelfiltrationschromatographie bestimmt. Hierfür wurde eine Sephacryl 200-Säule (30 mL Säulenvolumen) verwendet, die in Laufpuffer äquilibriert wurde. Für die Gelfiltrationschromatographie wurden 1500 µL der vereinigten Hydroxyapatitfraktionen der ^{Dm}cN2-Reinigung mit Hilfe eines

Ambicon-Filters (Millipore) auf 130 μL eingeeengt und diese zusammen mit frischem DTT (5 mM) mit einer Flussrate von 0,2 mL/min auf die Säule geladen. Es wurden Fraktionen mit einer Größe von 0,5 mL gesammelt und diese anschließend mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert. Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts der $\text{D}^{\text{m}}\text{cN2}$ wurden verschiedene Eichproteine (Ovalbumin, bovines Serumalbumin, Ferritin, Catalase, Thyroglobulin) ebenfalls der gleichen Sephacryl 200-Chromatographie unterzogen. Mit Hilfe des bekannten Molekulargewichts dieser Eichproteine und ihrer spezifischen Retentionszeit wurde die molekulare Größe der $\text{D}^{\text{m}}\text{cN2}$ berechnet.

Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2, 200 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 10% (w/v) Saccharose, 20°C

5.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde direkt über den proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten bei einer Absorption von 280 nm bestimmt. Als Alternative wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford mit einer kommerziell erhältlichen Lösung nach Herstellerangaben durchgeführt (RotiQuant, Roth). Dabei wurde die Konzentration des Proteins durch den Vergleich zu einer BSA (bovines Serumalbumin, Merck)-Kalibriergeraden ermittelt. In einigen Fällen erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung auch über eine SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des SDS-Gels. Dabei wurde eine BSA-Eichreihe zur densitometrischen Kalibrierung mit auf das Gel geladen. Die Quantifizierung der angefärbten Proteinbanden erfolgte mit dem Programm ImageQuant (ImageQuant Software®).

5.5.4 Analyse der Proteingesamt-molekülmasse mittels MALDI-TOF-MS

Die Identität der Proteine wurde nach der Reinigung bis zur Homogenität über Ermittlung der Gesamt-molekülmasse geprüft. Hierfür wurden die Proben über C4-ZipTip-Spitzen entsalzt und nach dem Millipore-Protokoll konzentriert (ZIP TIP® protocol, www.millipore.com). Die Elution erfolgte jedoch in einem Schritt in 15 μL . Das Eluat wurde freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Martin-Luther-

Universität Halle/Wittenberg) mit α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure versetzt und direkt auf einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Ultraflex-II TOF/TOF, Bruker Daltonic) analysiert.

5.5.5 Ultrazentrifugation

Das native Molekulargewicht wurde über Sedimentationsexperimente im Gleichgewicht ermittelt. Mit Hilfe dieser Methode kann der Oligomerisierungsstatus des zu untersuchenden Proteins in Lösung ermittelt werden. Hierfür wurden die Proteinlösungen bei 20°C und 12000•rpm in einer Beckmann X-LA Zentrifuge für drei Tage ultrazentrifugiert (PD Dr. Hauke Lilie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg). Die Proteinkonzentration der zu analysierenden Lösung betrug 1 mg/mL. Als Abgleichsprobe wurde der zur Reinigung verwendete finale Dialysepuffer verwendet. Das native Molekulargewicht konnte dann durch die Formeln 6 und 1 berechnet werden (Cole et al. 2008):

$$\frac{d \ln [c]}{dr^2} = \frac{(M \cdot (1 - v\rho) \cdot \omega^2)}{2RT} = \frac{\sigma}{2} \quad (\text{Formel 6})$$

mit c , als makromolekularer Konzentration, r , als Distanz vom Rotationszentrum und σ für $M \cdot (1 - v\rho) \cdot \omega^2$, mit M , als die apparente, molare Proteinmasse; v , als partialspezifisches Volumen des Makromoleküls, ρ , als die Dichte des Lösungsmittels, ω , als die Winkelgeschwindigkeit, R , als ideale Gaskonstante und T , als die Temperatur.

5.5.6 Westernblot-Analyse

Für die Anfertigung eines Westernblots wurden die Proteine durch eine SDS-PAGE der Größe nach getrennt (Marker: *prestained protein* Marker (Thermo Scientific)). Anschließend erfolgte die Übertragung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran im *semi-dry blot*-Verfahren (Green und Sambrook 2012). Die Übertragung wurde mittels Ponceau S-Färbung kontrolliert. Dieser Schritt erfolgte jedoch nur bei Proteindetektion mittels *horse radish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörpern. Die Membran wurde anschließend mit 1xTN-Tween wieder entfärbt. Die Membran wurde mit 5%igem Milchpulver (Sucofin) oder 5%igem BSA (Merck) in 1xTN-

Tween für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem ersten spezifischen Antikörper für mindestens 1 Stunde (s. A.1.II.6). Nach dreimaligem Waschen für 5 bis 10 Minuten mit 1xTN-Tween erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde (s. A.1.II.6). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xTN-Tween erfolgte die Detektion der Proteinbanden über ein Chemolumineszenz-Verfahren (WestPico) mit Hilfe von Röntgenfilmen (Chemolumineszenzfilm, GE Healthcare). Anschließend wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm durch übliche Fotochemie mit Entwicklungs- und Fixierungsschritt sichtbar gemacht (Röntgen Bender). Wurde als sekundärer Antikörper ein IR-gekoppelter Antikörper zur Detektion verwendet, erfolgte die Detektion durch ein Licor-Gerät und Auswertung über das Programm Odysse (Odysse2000®).

1xTransferpuffer: 48 mM Tris-HCl-Puffer pH 9,2, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20% Methanol in Wasser

Ponceau-S: 0,5% Ponceau-S in 1% Essigsäure

1xTN-Tween: 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20

5.5.7 Antikörperreinigung

Da das aus Ratten gewonnene ^{Dm}cN3B-antikörperhaltige Serum (Eurgentec®) im Westernblot mehrere Kreuzreaktionen aufwies, wurde der ^{Dm}cN3B-Antikörper durch seine Affinität zur ^{Dm}cN3B gereinigt. Es wurde eine SDS-PAGE mit insgesamt 100 µg rekombinanter ^{Dm}cN3B durchgeführt. Das Protein wurde durch das *semi dry*-Westernblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und der Blot mit Ponceau S inkubiert. Der Membranbereich mit angefärbter ^{Dm}cN3B wurde ausgeschnitten und in 1xTN-Tween entfärbt. Der Streifen wurde mit 5% Milchpulver in 1xTN-Tween blockiert, mit 1xTN-Tween gewaschen und mit dem Serum inkubiert (Charge 104; 0,5 mL auf 20 mL 1xTN-Tween mit 5% Milchpulver). Nach erneutem Waschen wurde der Membranstreifen kleingeschnitten und die Schnipsel mit 0,1 M Glycinlösung (pH Gradient 3; 2,5; 2) beträufelt. Der durch Zentrifugation erzeugte Überstand wurde abgenommen und langsam in zwei Volumen 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) getropft. Die Spezifität der neutralisierten Überstände wurde erneut durch das Westernblot-Verfahren bestimmt. Hierbei wurde sowohl die Erkennung der

rekombination ^{Dm}cN3B titriert als auch die Erkennung nativen Proteins im *D. melanogaster*-Embryoextrakt und S2-Zellextrakt. Dabei zeigte der Überstand 2 (Elution mit Glycinlösung pH 2,5) die besten Resultate und wurde fortan für die Westernblot-Analysen verwendet.

5.6 Biochemische Methoden

5.6.1 Darstellung von ³²P-m⁷GMP und ³²P-m⁷G-cap-RNA

Radioaktivmarkierte ³²P-m⁷G-cap-RNAs sowie ³²P-m⁷GMP wurden wie in Buschmann et al. 2013 beschrieben dargestellt. Durch *in vitro*-Transkription wurde eine 38-nukleotidlange RNA (Wiederholung des Sequenzmotivs CCCACCCUCUCCCCAAG) synthetisiert (Uhlenbeck 1987). Nach Reinigung und Fällung wurde die RNA (72 ng) durch Verwendung des *vaccina virus capping*-Enzyms (20 U) mit einem 5'-m⁷G-³²p-pp-cap versehen (ScriptCap m⁷G capping Kit, Epicenter Biotechnology, nach Herstellerangaben). Die 5'-m⁷G-RNA wurde erneut gereinigt, gefällt und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Zur Darstellung von ³²P-m⁷GMP wurden 60 ng der RNA zunächst durch Inkubation mit P1-Nuklease (1 U, Biomol, nach Herstellerangaben) zu 5'-NMPs und m⁷G-³²p-ppN verdaut. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit humanem GST-DcpS (50 ng, Expressionsplamid von H. Song, Nationale Universität Singapur). Das DcpS spaltet das m⁷G-³²p-ppN zu ³²P-m⁷GMP und NDP. Die Vollständigkeit dieses Verdaus wurde mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie kontrolliert (s. 5.6.3).

5.6.2 Darstellung von ³²P-NMPs

Kommerziell erworbenes α-³²P-NTP (5 µL, Perkin Elmer) wurde mit 5 Units Apyrase (Sigma-Aldrich, nach Herstellerangaben) für 30 min bei 37°C verdaut. Das entstandene Produkt ³²P-NMP wurde über Acrylamidgelelektrophorese (20%iges Acrylamidgel, 20 W, 25 min, 0,75 mm Spacer) vom abgespaltenen Phosphat gereinigt. Die Laufhöhe des Produktes im Gel wurde durch die ³²P-Markierung des 5'-NMPs mit Hilfe von *phosphor image storage screening* detektiert und der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten.

Die Elution des 5'-³²P-NMPs erfolgte anschließend mit bidest. Wasser und das Eluat wurde bis zu seinem Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Identität des Produktes wurde durch Dünnschichtchromatographie (s. 5.6.3) mit entsprechenden Standardsubstanzen verifiziert.

5.6.3 Dünnschichtchromatographie

Der Substratumsatz der 5'-Nukleotidasen wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht. Hierfür wurde die 5'-Nukleotidasereaktion mit ³²P-markierten Verbindungen durchgeführt. Der 5'-Nukleotidasereaktion wurden während der Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Proben zum Abstoppen der Reaktion mit 1 µL EDTA (10 mM) versetzt und auf Eis aufbewahrt. Zur Analyse wurden 2 µL der Probe auf Polyethylenimin (PEI)-Celluloseplatten (Merck) aufgetragen, die Platten getrocknet und anschließend in einem entsprechenden Laufmittel entwickelt. Zur Auftrennung wurden folgende Laufmittel verwendet: für m⁷G- und C-Nukleotide 0,3 M LiCl, 1 M HCOOH; für A-Nukleotide 0,5 M LiCl, 1 M HCOOH; für G-Nukleotide 0,8 M NaCl, 1xTBE. Die DC-Platten wurden anschließend getrocknet und die Nukleotide entweder über UV-Absorption oder über ihre ³²P-Markierung mittels *phosphor image storage screening* detektiert.

5.6.4 Phosphattest mit Malachitgrünoxalat

Die Quantifizierung des durch die 5'-Nukleotidasen freigesetzten Phosphates erfolgte mit Hilfe eines colorimetrischen Tests, der spezifisch freies Orthophosphat detektiert und nicht auf Pyrophosphat reagiert. Zur Bestimmung der Menge an freigesetztem Orthophosphat wurde der Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün als Oxalatsalz verwendet (Protokoll modifiziert nach Fisher und Higgins 1994, Geladopoulos et al. 1991 und Baykov et al. 1988). Der Test war für die Messungen hinreichend sensitiv, kostengünstig und einfach in der Handhabung. Für die Präzision des Testes und dessen Reproduzierbarkeit war jedoch die Verwendung frisch hergestellter Färbelösungen essentiell. Hierfür wurde zunächst eine 0,12%ige Malachitgrünoxalat-Stammlösung in 3,1 M Schwefelsäure dargestellt (ein Jahr stabil bei Raumtemperatur). Unmittelbar vor

Gebrauch wurden 5 mL der Stammlösung mit 20%iger Ammoniummolybdat-Tetrahydratlösung versetzt, um eine Ammoniummolybdatkonzentration von 3,2% einzustellen (entspricht dann der Färbelösung). Die Färbelösung wurde maximal zwei Tage verwendet, jedoch sofort verworfen sobald schwerlösliche Ammoniummolybdat-Malachitgrünoxalatkomplexe visuell wahrnehmbar waren. Für die Phosphatbestimmung wurde ein Verhältnis von 1 zu 4 von Färbe- zu untersuchender Probelösung gewählt und nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur die Absorption bei 630 nm gemessen (molarer Absorptionskoeffizient $90000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; U3000 Spektrophotometer, Hitachi). Für jede Analyse mit frischer Färbelösung wurde eine Eichkurve mit einer Standardphosphatlösung im entsprechenden Puffer erstellt. Die mathematische Anpassung der Kurve erfolgte quadratisch durch SigmaPlot8.0, da die erhaltene Kurve sowohl bei sehr niedrigen als auch sehr hohen Phosphatkonzentrationen nicht linear war (s. A.1.1.7). Die zu analysierenden Proben wurden vor Zugabe der Färbelösung in der Regel mit Wasser vorverdünnt, um in den linearen Bereich des Messsystems zu kommen (zwischen 1-25 μM Phosphat).

5.6.5 Standardbedingungen für die kinetischen Messungen

Für die kinetischen Messungen wurde ein Standardreaktionsansatz auf Eis vorgelegt und mit Substrat versetzt. Hierbei wurde wenn möglich mit Masteransätzen gearbeitet. Bevor die Reaktion durch Zugabe von Enzym gestartet wurde, wurde der Reaktionsansatz bei den entsprechenden Reaktionsbedingungen fünf Minuten vortemperiert. Die Vermessung der *D. melanogaster*-Enzyme erfolgte bei 25°C und die der humanen Enzyme bei 37°C. Für die Reaktionen wurden standardmäßig silanisierte Reaktionsgefäße verwendet (Eppendorf). Da der Phosphattest nur eine Möglichkeit zur Endpunktbestimmung darstellt, wurden aus einem Ansatz zu ausgewählten Zeitpunkten Proben entnommen und diese auf ihren Phosphatgehalt analysiert. Es wurde für jede Messreihe eine Nullprobe mitgeführt, die statt Substrat ein entsprechendes Volumen an Wasser enthielt. Zu Beginn einer Messung wurde jedes Substrat und Enzym auf Phosphatkontamination geprüft und diese bei der Auswertung der kinetischen Messung berücksichtigt. Für jede Kinetik wurden mindestens vier

Zeitpunkte entnommen und jede Messreihe mindestens zwei Mal und bis zu vier Mal wiederholt.

Standardreaktionsansatz: 20 mM HEPES-Puffer pH 7,5, 150 mM Kaliumacetat, 2,5 mM Magnesiumacetat

Zusätze: 3 mM DTT, 10% (w/v) Saccharose

5.6.6 Präparation ribosomaler RNA und deren Abbau zu Nukleosiden

Es wurden je 250 μL Embryoextrakt (s. 5.7.4) von 0,5-4,5 h alten Wildtyp- und $\text{Dm}^{\text{cN3B}^{-1/-D. melanogaster}$ -Embryonen mit 5 μL RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U/ μL , Invitrogen) versetzt und für 15 min bei 20000•g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert. Vom resultierenden Überstand wurden 175 μL entnommen und diese auf ein 10%iges Saccharosekissen (in Puffer A) in einem Ultrazentrifugationsröhrchen geschichtet. Anschließend wurden die Ribosomen durch Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 4°C pelletiert (60000•rpm, Beckmann TLA 100.4 Rotor, entspricht ca. 126000•g). Die klare, flüssige Phase über dem Kissen wurde abgenommen und der Bereich mit 200 μL Puffer A gewaschen ohne das Saccharosekissen aufzuwirbeln. Dann wurde sukzessive der Puffer, das Saccharosekissen und letztlich die proteinhaltige Phase entfernt. Die pelletierten Ribosomen wurden zweimal mit 100 μL Puffer A gewaschen und für 3 Stunden bei 4°C im EDTA-haltigen Puffer B (50 μL) gelöst. Die durch das EDTA separierten Untereinheiten der Ribosomen wurden anschließend durch eine Saccharosegradientenzentrifugation getrennt (5-25%iger Saccharosegradient; 4,25 h bei 38000 rpm, Beckmann-Ultrazentrifuge, SW40 Rotor). Anschließend wurde der Gradient fraktioniert und die UV-Absorption der Fraktionen bei 260 nm gemessen. Aus den Peakfraktionen wurde die RNA extrahiert und anschließend mit LiCl und Isopropanol gefällt. Lithiumchlorid fällt spezifisch lange RNA-Moleküle. Nach Waschen der RNA-Pellets mit 70%igem Ethanol wurden diese in 20 μL DEPC-Wasser gelöst und anschließend die RNA-Konzentration spektrometrisch bestimmt. Für die Nukleosidpräparation wurden 5 μg der rRNA mit 3 Units XRN1-Exonuklease (NEB) nach Herstellerangaben für 3 h bei 37°C verdaut. XRN1 ist eine hochprozessive 5'-3' Exoribonuklease, die RNA unspezifisch zu 5'-Nukleosidmonophosphaten abbaut. Der

vollständige Abbau der RNA wurde über Agarosegelelektrophorese überprüft. Die 5'-NMPs wurden dann mit 1,5 µL alkalischer Phosphatase (CIP, Merck, 10 U/µL) für 3 h bei 37°C weiter zu Nucleosiden und Phosphat abgebaut. Der vollständige Abbau wurde hierbei durch Bestimmung der Phosphatkonzentration mit dem Malachitgrünoxalattest kontrolliert. Die präparierten Nucleoside wurden anschließend bis zu ihrer Analyse bei -20°C gelagert.

Puffer A: 20 mM HEPES-Puffer pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 100 mM KCl, in DEPC-Wasser

Puffer B: 20 mM HEPES-Puffer pH 7,4, 2 mM DTT, 500 mM KCl, 25 mM EDTA in DEPC Wasser

5.6.7 Nucleosidanalyse über HPLC und Massenspektrometrie

Die Analyse der aus rRNA präparierten Nucleoside wurde freundlicherweise von Dr. Christian Ihling (Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Sinz, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg) durchgeführt. Die Proben wurden auf Adenosin-, Guanosin und 7-Methylguanosin Gehalt über eine Kombination aus HPLC (Agilent 1200 capillary HPLC system) und Massenspektrometrie (LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer) untersucht. Die Nucleoside wurden hierbei über eine *reversed phase* C18-Säule (Jupiter C18, Phenomenex) aufgetrennt und die Eluate direkt in das Massenspektrometer geleitet und durch Elektrosprayionisierung ionisiert und durch eine Ionenfalle aufgefangen (*linear ion trap*). Zur Auswertung standen Ionenchromatogramme zur Verfügung. Zur Kalibrierung der erhaltenen relativen Abundanzen wurde den zu analysierenden Proben vorab eine bestimmte Menge deuteriertes 7-Methylguanosin beigemischt (hergestellt durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Wessjohann, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)).

5.6.8 Nucleotidextraktion

Für die Extraktion des zellulären Nucleotidpools wurden die gesammelten *D. melanogaster*-Embryonen zunächst durch Behandlung mit 6%iger Natriumhypochlorit-Lösung dechorionisiert (Sullivan et al. 2000). Dann wurden die Embryonen gründlich mit Wasser gewaschen und das Wasser anschließend möglichst vollständig durch

Papiertücher abgesaugt. Die Feuchtmasse der Embryonen wurde bestimmt und 5 µL eiskalte Perchlorsäure (0,33 M)/mg Feuchtmasse zugesetzt (Gebelein et al. 1992). Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Pistills auf Eis aufgeschlossen und für 20 min auf Eis inkubiert. Für die Nukleotidextraktionen wurden mindestens 25 mg und maximal 150 mg Embryonen aufgeschlossen, da für kleinere oder größere Mengen ein vollständiger Aufschluss nicht gewährleistet werden konnte. Durch die Behandlung mit Perchlorsäure wurden spezifisch Proteine und Nukleinsäuren gefällt, während Nukleotide in Lösung blieben. Anschließend wurde der Ansatz mit 1,67 µL K₂CO₃ (1 M)/mg Feuchtmasse neutralisiert und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von K₂CO₃ zur perchlorsäurehaltigen Lösung wird überschüssiges Perchlorat durch Ausbildung eines schwerlöslichen Kaliumperchloratsalzes gefällt und dabei CO₂ freigesetzt. Die Probe wurde dann bei 20000•g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde zunächst die Fettschicht über dem Überstand entfernt und dann anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

5.6.9 HPLC-Analyse der Nukleotide

Zur Analyse der extrahierten Nukleotide wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt (Gebelein et al. 1992). Hierfür wurden 50 µL Probe auf eine C18-Säule (SuperCosil LC, 15 cm x 4,6 mm x 3 µm; System LaChrom 7000) geladen und die verschiedenen Nukleotidspezies durch eine Ionenpaar-*reversed phase*-HPLC aufgetrennt. Die Säule wurde zu Beginn jeden Laufes in Puffer A äquilibriert und dann folgendes Programm zur Auftrennung verwendet: 0-2,5 min 0% Puffer B, 2,5-85 min Gradient von 0-100% Puffer B, 85-100 min Gradient von 0-100% Puffer A. Während des Laufes wurden alle Wellenlängen zwischen 200 bis 400 nm durch einen Diodenarray-Detektor aufgezeichnet. Die Nukleotidspezies wurden anhand von Standardsubstanzen und ihrem spezifischen Absorptionsprofil identifiziert. Für eine Quantifizierung der Nukleotidspezies im Extrakt wurde die HPLC-Analyse zunächst mit den Standardsubstanzen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt und eine

Eichgerade durch lineare Regression zu jedem Nukleotid erstellt. Anschließend konnte durch die erhaltenen Peakflächen der Nukleotide im Extrakt deren Konzentration durch die Eichgerade berechnet werden. In Tab. A.1.II.7 wurden die Extinktionskoeffizienten, sowie maximalen Absorptionswellenlängen der verwendeten Nukleotide zusammengefasst.

Puffer A: 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,2, 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

Puffer B: 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,2, 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 10% Acetonitril

5.6.10 Phosphotransferasereaktion

Die Phosphotransferaseaktivität der $^{Dm}cN3B$ wurde zunächst durch Dünnschichtchromatographie (s. 5.6.3) mit ^{32}P -markierten Substraten untersucht. Hierfür wurden 200 ng Enzym (2 ng/ μ L) mit 300 μ M ^{32}P -markiertem 5'-CMP bzw. 5'-UMP unter Standardreaktionsbedingungen für 40 min inkubiert. Während der Inkubation wurden dem Ansatz Proben entnommen (5, 10, 20, 40 min) und diese über Dünnschichtchromatographie auf Substratumsatz analysiert. Das Experiment wurde mit denselben Reaktionsbedingungen wiederholt, jedoch wurden den Ansätzen steigende Konzentrationen an nichtmarkiertem 7-Methylguanosin beigefügt (0,5-2 mM). Der Einfluss dieser Zugabe auf den Substratumsatz wurde ebenfalls über DC untersucht. Da bei dieser Methode nur das ^{32}P -markierte Phosphat verfolgt werden konnte, wurde das Experiment mit nichtmarkierten Substraten wiederholt und die Auswertung über HPLC vorgenommen (5.6.9). Die $^{Dm}cN3B$ (2 ng/ μ L) wurde mit 300 μ M 5'-CMP unter Standardreaktionsbedingungen mit 2 mM Uridin inkubiert und die Reaktion nach 120 min durch Zugabe von Perchlorsäure (0,33 M) gestoppt. Die Aufarbeitung der Reaktion und anschließende HPLC-Analyse wurde wie in 5.6.8-9 beschrieben durchgeführt.

5.6.11 Bestimmung der dNTP-Konzentrationen

Die Konzentration der dNTPs in den Nukleotidextraktionen wurde enzymatisch mit Hilfe von DNA-Polymerasen bestimmt (Ferraro et al. 2010; Sherman und Fyfe 1989). Durch die Verwendung von speziellen Oligodesoxynukleotidpaaren (s. A.1.II.8) mit einer 5'-überhängenden Sequenz kann spezifisch der Einbau der verschiedenen dNTPs in Relation zum Einbau von ^{32}P - α -dATP (bzw. ^{32}P - α -dTTP für die Konzentrationsbestimmung von dATP) durch die DNA-Polymerasen bestimmt werden. Die Reaktion wurde wie in Ferraro et al. 2010 beschrieben durchgeführt (40 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,25 μM Oligodesoxynukleotidpaar, 0,25 μM dATP/dTTP (markiert mit ^{32}P - α -dATP/dTTP), DNA-Polymerase und das zu analysierende dNTP). Die Messung der dGTP- und dCTP-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase (2 U/ 100 μL Reaktion, 1h bei 48°C, Promega) und für die dTTP- und dATP-Konzentrationsbestimmung wurde Klenow-DNA-Polymerase (0,2 U/ 100 μL Reaktion, 1h bei 37°C, NEB) verwendet. Zur Bestimmung der eingebauten Menge an ^{32}P -markiertem dNTP wurde der Reaktionsansatz auf DE81-Papier geträufelt. Das DE81-Papier wurde anschließend gründlich gewaschen (jeweils 10 min mit dreimal 5%iger Na_2HPO_4 -Lösung, einmal mit Wasser und einmal mit 75% Ethanol), um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Das DE81-Papier wurde dann in ein Szintillationsgefäß überführt und die Menge an eingebautem ^{32}P -dNTP durch ein Szintillationsmessgerät bestimmt. Für jedes dNTP wurde zunächst eine Eichgerade erstellt in der die eingebaute Menge an radioaktivmarkiertem dNTP linear mit der eingesetzten Menge an zu bestimmendem Desoxynukleotid korrelierte (s. A.1.I.8). Anschließend wurde das Experiment mit verschiedenen Mengen der aus den Embryonen extrahierten Nukleotide wiederholt, die eingebaute Radioaktivität bestimmt und durch die Eichgeraden die Konzentration des jeweiligen dNTPs berechnet.

5.7 *Biologische Experimente*

5.7.1 *Drosophila melanogaster*-Anzucht und Embryonenernte

Die Fliegenhaltung, -kreuzung und -vermehrung wurden in der Arbeitsgruppe Reuter, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg mit Hilfe von Dr. Thomas Rudolph und Matthias Walther durchgeführt. Die Fliegen, die für Kreuzungsversuche verwendet wurden, wurden in Glasröhrchen auf getreidehaltigem Nährmedium gehalten und mindestens einmal im Monat auf frisches Medium umgesetzt (Sullivan et al. 2000). Zur Vermehrung wurden die Fliegen auf hefehaltiges Medium überführt und in einem Anzuchtraum bei konstanten Kultivierungsbedingungen gehalten (25°C und 45% Luftfeuchtigkeit). Die Embryonenablage erfolgte in Ablagekäfigen auf Apfelsaft-haltigen Agarplatten, die mit etwas Hefepaste bestrichen wurden. Die Platten wurden nach Beendigung der Sammlung aus den Käfigen entfernt. Die Embryonen wurden mit Wasser von den Platten gespült und über ein Siebsystem von adulten Fliegen getrennt und gesammelt.

5.7.2 *Proteinexpression während der D. melanogaster-Entwicklung*

Zur Untersuchung der Proteinexpression während der *D. melanogaster*-Embryonalentwicklung wurde eine Agar-Apfelsaftplatte mit etwas Hefe bestrichen und die Platte in einen Ablagekäfig gestellt. Nach zwei Stunden wurde die Platte entfernt und davon 50 abgelegte Embryonen gesammelt. Die Embryonen wurden in 50 µL SDS-Ladepuffer (2x) bei 95°C für 10 min gekocht. Der Vorgang wurde alle 2 h mit Embryonen der Platte wiederholt, bis zu einem Embryonalalter von 20-22 h. Für die Untersuchung der Proteinexpression im Larvenstadium wurden 50 Larven des L1-Stadiums, 15 Larven des L2-Stadiums und 3 Larven des späten L3-Stadiums gesammelt und diese ebenfalls in 50 µL SDS-Ladepuffer gekocht. Zusätzlich wurden 3 männliche und 3 weibliche adulte Fliegen in je 50 µL SDS-Ladepuffer gekocht. Von diesen Proben wurden je 10 µL auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und eine SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine durchgeführt. Die ^{Dm}cN3B-Expression wurde anschließend mit dem Westernblot-Verfahren geprüft (s. 5.5.6).

5.7.3 Erfassung des Entwicklungsprofils

Die Gesamtanzahl der Nachkommen wurde wie folgt ermittelt: Es wurden je Stamm zehn Männchen mit 25 Jungfrauweibchen in einem Kultivierungsröhrchen für 48 h zusammen gebracht. Nach ca. zehn Tagen bei 25°C schlüpften die ersten adulten Fliegen der F1-Generation. Diese wurden gezählt und anschließend aus dem Röhrchen entfernt. Diese Prozedur wurde jeden Tag wiederholt, solange bis alle Nachkommen geschlüpft waren. Zur Bestimmung der Anzahl geschlüpfter L1-Larven wurden je Stamm dreimal 50 Embryonen (Ablagealter 0-4 h) auf eine frische Agarplatte überführt und nach 24 h die Anzahl geschlüpfter L1-Larven bestimmt. Die L1-Larven wurden von der Platte entfernt und nach 12 h erneut die Anzahl der nachgeschlüpften L1-Larven bestimmt. Dieser Vorgang wurde bis 72 h nach Embryonenablage wiederholt. Die Bestimmung der Verpuppungsrate, bzw. Schlupfrate adulter Tiere wurde folgendermaßen durchgeführt: Es wurden je Stamm dreimal 25 L1-Larven in Kultivierungsröhrchen überführt und bei 25°C inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die Anzahl verpuppter Individuen ermittelt. Die Zählung wurde jeden Tag wiederholt (insgesamt 4 Tage). Die Anzahl geschlüpfter Fliegen wurde anschließend bestimmt. Hierfür wurden die geschlüpften Fliegen gezählt und anschließend aus dem Röhrchen entfernt. Auch diese Zählung wurde 4 Tage lang durchgeführt.

5.7.4 Embryonenextraktpräparation

Der *D. melanogaster*-Embryonenextrakt (Wildtyp und Mutanten) wurde nach dem Protokoll von Jeske und Wahle 2008 präpariert. Hierfür wurden die Embryonen in Embryonenpuffer mit einem Handhomogenisator nach Dounce aufgeschlossen und der Extrakt bei 20000•g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefrostet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Auf ähnliche Weise wurde S2-Zellextrakt hergestellt. Hierfür wurden S2-Zellen durch Inkubation mit einem hypotonischen Puffer aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand mit 50 mM Kaliumacetat, 2 mM Magnesiumacetat und 0,5 g/L Pefabloc (Roche Diagnostics) supplementiert.

Anschließend wurde der Überstand in Flüssigstickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

Embryonenpuffer: 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,5 mM AEBSF (AppliChem), 10% Glycerin (w/v), bei 25°C

Hypotonischer Puffer: 10 mM HEPES-Puffer pH 7,4, 10 mM Kaliumacetat, 1 mM Magnesiumacetat, 5 mM DTT

5.7.5 Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen

Es wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstufen gesammelt, gründlich mit 6%iger Natriumhypochloritlösung dechorionisiert und anschließend mit Wasser und Embryonenwaschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte entweder eine Fixierung mittels Hitzeschock oder mittels Formaldehydinkubation (Sullivan et al. 2000). Der Hitzeschock der dechorionisierten Embryonen erfolgte kurz in 5 mL kochendem Embryowaschpuffer und wurde durch Zugabe von 45 mL eiskaltem Embryowaschpuffer abgestoppt. Die Embryonen wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μL Heptan und 500 μL 100% Methanol ausgeschüttelt, um die Vitellinmembran zu entfernen. Hierbei sanken die fixierten Embryonen zu Boden. Der Überstand wurde entfernt und die Embryonen anschließend noch zweimal mit Methanol gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 8°C in Methanol gelagert. Bei der Fixierung mit Formaldehyd wurden die dechorionisierten Embryonen mit 500 μL Heptan, 450 μL 1xPBS und 500 μL 3,7% Formaldehyd versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die heptanhaltige Phase gründlich abgenommen, ohne die in der Interphase befindlichen Embryonen zu entfernen. Die Interphase, sowie die verbliebene wässrige Phase wurden mit 500 μL 100% Methanol intensiv ausgeschüttelt. Fixierte Embryonen sanken dabei zu Boden. Der Überstand wurde abgenommen und die Embryonen erneut zweimal mit Methanol gewaschen. Die Lagerung erfolgte in Methanol bei 8°C . Die fixierten Embryonen wurden mehrmals mit 1xPBTA gewaschen. Es folgte die Zugabe des primären Antikörpers (1:25 α -^{Dm}cN3B in 1xPBTA) mit dem für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Embryonen wurden anschließend viermal für 15 min mit 1xPBT gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (α -^{Rn}Alexa488, 1:100 in 1xPBTA) inkubiert. Nach erneutem

Waschen wurden die Embryonen mit *mounting*-Medium (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen, enthält DAPI) versetzt, über Nacht bei 8°C inkubiert und dann auf Objektträgern fixiert.

Embryonenwaschpuffer: 0,7% (w/v) NaCl, 0,05% (v/v) Triton X-100 in Wasser

1XPBT±A-Puffer: 1xPBS, 1% (w/v) Bovines Serumalbumin, 0,05% (v/v) Triton X-100, 0,02% (v/v) NaN₃

5.7.6 Ovarienpräparation und Färbung

Es wurden je Stamm 16 Ovarien von befruchteten Weibchen nach dem Cooley-Protokoll präpariert (Verheyen und Cooley 1994). Hierfür wurden die Ovarien aus den Weibchen mit Pinzetten entfernt und in 1xPBS überführt und gewaschen. Das 1xPBS wurde anschließend entfernt und die Ovarien mit 100 µL Devitellinisierungspuffer sowie 600 µL Heptan versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Die flüssige Phase wurde entfernt und die Ovarien dreimal kurz und dreimal für 10 min mit 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Ovariolen aus den Ovarien freigelegt und diese mit 1xPBT für 10 min inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 8°C (1:50 α -^{Dm}cN3B in 1xPBT) und gründliches Waschen (dreimal kurz und viermal für 15 min mit 1xPBT). Anschließend wurden die Ovariolen mit dem sekundären Antikörper und DAPI für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert (sekundärer Antikörper α -^{Rn}Alexa488 1:200 in 1xPBT). Nach erneutem Waschen mit 1xPBT wurden die Ovariolen in 1xPBS gespült und auf Objektträger überführt. Dort wurden sie mit Mowiol (Sigma Aldrich) überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, LSM 780).

5.7.7 DNA- und RNA-Extraktion aus *D. melanogaster*

Für die Gewinnung von DNA aus adulten Fliegen für eine PCR-Analyse wurde das *squishing*-Protokoll (Dietzl-Protokoll, Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Dickson, Institut für molekulare Pathologie, Wien) verwendet: Ein bis zwei Fliegen werden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit einer Pipettenspitze zerkleinert und in 50 µL *squishing*-

Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Proteinase K im Puffer durch Hitzebehandlung inaktiviert (3 min bei 95°C). Die unlöslichen Fliegenbestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (Eppendorf Zentrifuge 20000•g für 10 min) pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Extraktion von RNA aus Fliegen sowie Embryonen wurde ebenfalls die *single step*-Methode mit Guanidiniumthiocyanat und Phenol (Trizol®, nach *life technologies*) verwendet. Hierfür wurden entweder 3 Fliegen oder 150 mg (Feuchtmasse nach dem Dechorionisieren) Embryonen zur Extraktion eingesetzt.

Squishing-Puffer: 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/mL Proteinase K

5.7.8 UV-Belastungsexperiment mit L2-Larven

Es wurden je 60 L2-Larven je Stamm auf vorgekühlte Agarplatten (8°C) gelegt und mit verschiedenen Dosen an UV-Licht bestrahlt (300-800 J/m²; UV Stratalinker 1800, Stratagene). Direkt nach der Bestrahlung wurden die L2-Larven in Kultivierungsröhrchen (20 Larven/ Röhrchen) überführt und ihre Entwicklung visuell verfolgt. Es wurde die Schlupfrate adulter Tiere bestimmt.

Anhang

A.1 Zusätzliche Daten

I. Abbildungen

Abb. 1 Schematische Darstellung des Pyrimidinabbaus.

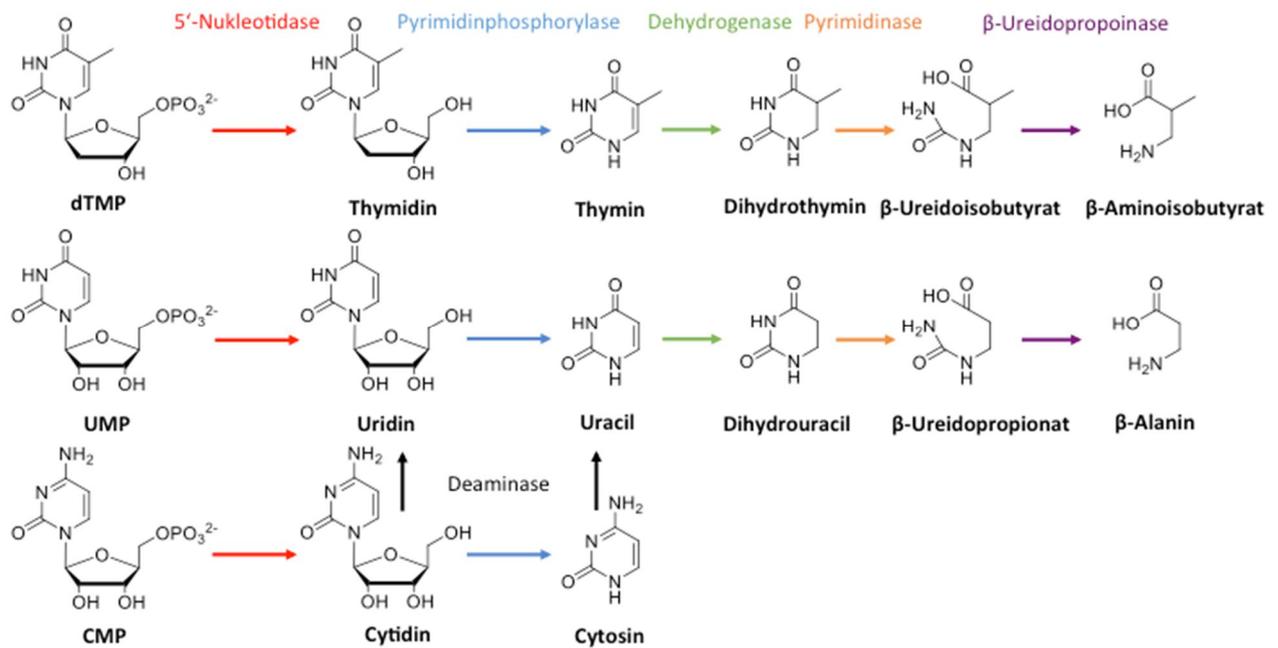


Abb. 2 Primärsequenzvergleich der cN3-Nukleotidasen verschiedener Organismen mit Hilfe des Programms ClustalX (Larkin et al. 2007): Os, *Oryza sativa*, Ce, *Caenorhabditis elegans*, Dm, *Drosophila melanogaster*, Dr, *Danio rerio*, Xt, *Xenopus tropicalis*, Gg, *Gallus gallus*, Ac, *Anolis carolinensis*, Mm, *Mus musculus*, Hs, *Homo sapiens*. Die Sequenzen wurden durch das blast-Programm (*basic local alignment search tool, pubmed*-Datenbank) identifiziert. In rot sind die katalytischen Motive I-III markiert. In dunkelblau sind die 4 Aminosäuren markiert, die direkt an der Koordination des Nukleobaserings beteiligt sind.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment
Os_cN3      -----0
Ce_cN3      MQGFYVMDDKKTVEQVIAEKEKEKEFGGKIKIVEFICFEVGEVAAQLmsnkvarrlgkcl 60
Dm_cN3B     -----0
Dr_cN3      -----0
Xt_cN3A     -----0
Gg_cN3A     -----0
Ac_cN3A     -----0
Mm_cN3A     -----0
Hs_cN3A     -----0
Xt_cN3B     -----0
Mm_cN3B     -----0
Hs_cN3B     -----0
Gg_cN3B     -----0
Ac_cN3B     -----0

Os_cN3      -----ps-----s-----sssrllllr 12
Ce_cN3      fvsgrrrfesrqsilqlrtetltdtplsatltdqsfsmfkaaeivnaaaaceae----- 114
Dm_cN3B     -----0
Dr_cN3      -----masatvcalfggvvfaq 17
Xt_cN3A     -----0
Gg_cN3A     -----0
Ac_cN3A     -----mdksavar--mgavasasvcalvggvvlaq 28
Mm_cN3A     -----0
Hs_cN3A     -----mraps-----mdraavar--vgavasasvcalvagvvlag 33
Xt_cN3B     -----0
Mm_cN3B     -----0
Hs_cN3B     -----0
Gg_cN3B     -----0
Ac_cN3B     -----0

Os_cN3      lllsrrrspasrppplrrrlpllaasmsssstaatrnpgsvvadadglarkvaaira 72
Ce_cN3      cieqlk--t-----dvvpllmn-----y1lgee qilvadptavaaklrkmv 155
Dm_cN3B     mgfdekreptg-----grlrlqdi-----paltqdhcrmrpaeveriinefvi 44
Dr_cN3      yiftkkragk-----ktkiemm-----pefekntvhirdperveiioglik 61
Xt_cN3A     -----mm-----pefqkksvhikdperveiioglik 27
Gg_cN3A     -----m-----pefqkktvhikdprveiioglik 26
Ac_cN3A     yiftvkkktgr-----ktkiemm-----pefqkktvhikdprveiioglik 72
Mm_cN3A     -----mtnqe-----savh1kmm-----pefqkssvriknptrveiioglik 38
Hs_cN3A     yiftlkrktgr-----ktkiemm-----pefqkssvriknptrveiioglik 77
Xt_cN3B     -----mll-----pvlskdtvrmkdpegvqekirlmhk 28
Mm_cN3B     -----maeev-----sslmkatv1mrqpgrvqeivgalrr 30
Hs_cN3B     -----maeev-----stlmkatv1mrqpgrvqeivgalrk 30
Gg_cN3B     -----mv-----pelqkstvriqqpervmgviraike 27
Ac_cN3B     -----mv-----pelekasvrmknpeqvkniiisllrk 27

: : : : :

```

Os_cN3	aggaklqv	adfdgtl	tryw-ydgsrgqsshgllrqgn----	eeydakreeelfehyhpie	127
Ce_cN3	ggagktvvis	dfdyt	lsrfaneqgerl	stthgvfddnvmrlkpelgqkfvdlknkyyppie	215
Dm_cN3B	ggpermqivs	dfdyt	itkqrte	dgavpssfgifnacq-slpnfkaetdklyhkyrpie	103
Dr_cN3	ggasklqiit	dfdm	tsrfa-vngkrcpschniidnsk-	lvtddcrkklvhlketyypie	119
Xt_cN3A	ggasklqv	itdfdm	tskfs-hngkrcptchniidnck-	litdecrkklfqlkekyyaie	85
Gg_cN3A	ggaaklqiit	dfdm	tsrfs-yngkrcptchniidnsk-	liteecrkkllqlketyyaie	84
Ac_cN3A	ggatklqiit	dfdm	tsrfs-hngkrcptchniidnck-	litdesrkklyqlkeiyyaie	130
Mm_cN3A	ggaaklqiit	dfdm	tsrfs-yngkrcptchniidnck-	lvtdecrkklqlkeqyyaie	96
Hs_cN3A	ggaaklqiit	dfdm	tsrfs-ykgkrcptchniidnck-	lvtdecrkklqlkekyyaie	135
Xt_cN3B	gggqklqv	isdfdm	tsrfs-fngereptcyniidnsn-	iisdecrkklkglfntyypphe	86
Mm_cN3B	gggdr	lqv	isdfdm	tsrfa-yngqrcpsshnildnsk-iisedcrkeltelfhhyppie	88
Hs_cN3B	gggdr	lqv	isdfdm	tsrfa-yngkrcpssynildnsk-iiseecrkel tallhhyppie	88
Gg_cN3B	qgcsklqv	isdfdm	tsrfg-cngrrcptshnildnsh-	visedgkkklkdlhhhyppie	85
Ac_cN3B	ggaerlqv	isdfdm	tsrfg-fngkrcptshnildnsr-	vineegrkklkdlhhyyppie	85
	*	:	:::	*** *::: .*	: .:: : * . *

Motiv I

Os_cN3	icpdip	lpekaklmeew	wekthalliegg	ltyeairqsvadakitfrdgvvklfefe	187				
Ce_cN3	fspnlt	meekiphmek	wwgtshslivnekfskntied	fvrqsrivfkdgadefiealdah	275				
Dm_cN3B	idphmp	iaekvqymie	wwtksgel	tsfgfpdqseidqiaskythalrdrtheffadlqrl	163				
Dr_cN3	idphl	tmeekyp	fmvewyfksh	tllveqrlekdklpeavresdvs	lkegyeqffdrhlqh	179			
Xt_cN3A	idpd	lsikekyp	ymvewytksh	tllidqrlqknklaeavrdsv	klkegyemffdlhkh	145			
Gg_cN3A	idpalt	ieekyp	ymvewynksh	alliegg	lqkdklaevvresdvm	lkegyenffdklseh	144		
Ac_cN3A	idpslt	ieekyp	ymvewynksh	alliegg	lqkdklseivresdvm	lkegyeqffdklhkh	190		
Mm_cN3A	vdpvt	veekfyp	mvewytksh	glliegg	ipkklkeivadsvml	kegyenffgklqqh	156		
Hs_cN3A	vdpvt	veekyp	mvewytksh	gllvqalp	kklkeivaesdvm	lkegyenffdklqqh	195		
Xt_cN3B	mdpks	veekyp	lmvewws	rahdll	yeqriqkdr	laqvkesnamlrngydlffn	slyqs	146	
Mm_cN3B	idphrt	ikeklph	mvqw	skahsl	lcqqriqkv	qiaqvvgestaml	regyktffdtlyqn	148	
Hs_cN3B	idphrt	vkeklph	mveww	tahnll	cqqkiqk	fqiaqvresnaml	regyktffntlyhn	148	
Gg_cN3B	idpnt	leekrpl	mveww	trahell	sqqkiqk	gdiavresdvm	lrdgfnelfdqlhky	145	
Ac_cN3B	idpyrt	vedklpl	mveww	tahnll	tqqkilks	disemvkesdvm	lrdgfn	tfddqlhqn	145
	.	*	:	::*	*::	: *	:	:: .	::: :: *

Os_cN3	dipvlv	fsagladiie	evfrqklhrs	fkni	kvvsnr	mvfneegr	lvsfkgk	tihvln	kne	247		
Ce_cN3	niplv	ifsagigni	ieyflqq	klgaip	rnthf	isnmil	fdeddn	acafse	plihtf	ckns	335	
Dm_cN3B	giptl	vsaglg	nsvs	vlrqa-n	vlhpn	vkvs	snflqfr-	dgll	dgfq	qpmiht	fnkne	221
Dr_cN3	svpv	fifsag	lgdvlee	irqa-g	vyhpn	vkvs	snfmd	fdng	vlkgf	kgelih	vynkhd	238
Xt_cN3A	sipv	fifsag	lgdile	evihqa-g	vyqpn	vkvis	snfme	fdeng	iitg	fkgeli	hvynkhd	204
Gg_cN3A	nipv	fifsag	igdvlee	vihqa-g	vyhsn	vkvs	snfmd	fdeng	ilkgf	kgelih	vynkhd	203
Ac_cN3A	nipv	fifsag	igdvlee	viqqa-g	vyhpn	vkvs	snfmd	fdeng	vlkgf	kgelih	vynkhd	249
Mm_cN3A	gipv	fifsag	igdvlee	virqa-g	vyhsn	vkvs	snfmd	fdeng	vlkgf	kgelih	vfnkhd	215
Hs_cN3A	sipv	fifsag	igdvlee	virqa-g	vyhpn	vkvs	snfmd	fdet	gvlkgf	kgelih	vfnkhd	254
Xt_cN3B	eipl	fifsag	igdvlee	irqk-g	vfhpnt	kvvs	nymd	fdng	imkgf	kgeli	htynkns	205
Mm_cN3B	nipl	fifsag	igdvlee	irqm-k	vfhpni	hiv	snym	dfsed	gflkgf	kgqli	htynkns	207
Hs_cN3B	nipl	fifsag	igdvlee	irqm-k	vfhpni	hiv	snym	dfned	gflqg	kgqli	htynkns	207
Gg_cN3B	svpm	fifsag	vgdvlee	irqa-n	vfypn	vnvs	nymd	fdsg	vlkcf	kspli	htynknn	204
Ac_cN3B	kvpl	fifsag	vgdvlee	irqa-g	afhpn	vnvs	nymd	fdsg	vlqg	fgkpli	htynknn	204
	::*	..****:	:::	*	..***:	*		*	**.	**.	..	

Motiv II

Teil Motiv III

Os_cN3	haldmaapvhdnlgdpngytddyslvkkrtnvlllgdhigclgmsdgl-yenriavgfl	306
Ce_cN3	sviqk-----etsffhdiagravnvillgdsimgdihmdvgverdgpilkvgyy	382
Dm_cN3B	tvln-----tseydlvhrdhiivmgdsigdadmasgvpashimkigfl	268
Dr_cN3	galrn-----teyfkqlkdngniillgdsigcltmdagvnpvenilkigyl	284
Xt_cN3A	galrn-----teyfahlkdnsniillgdsigcltmdagvnpvenilkigfl	250
Gg_cN3A	galkn-----teyfkqlkdnsniillgdsqgclsmadgvanvehilkigyl	249
Ac_cN3A	galkn-----teyfkqlkdnsniillgdsqgcltmdagvanvehilkigyl	295
Mm_cN3A	galkn-----tdyfsqlkdnsniillgdsqgclrmadgvanvehilkigyl	261
Hs_cN3A	galrn-----teyfnqlkdnsniillgdsqgclrmadgvanvehilkigyl	300
Xt_cN3B	svltd-----teyfkeighrtnivllgdtlgtlmdagvttveniikigfl	251
Mm_cN3B	svcen-----ssyfqqlnktniillgdsigcltmdagvpgvqnilkigfl	253
Hs_cN3B	sacen-----sgyfqqlegktnvillgdsigcltmdagvpgvqnilkigfl	253
Gg_cN3B	svlqg-----tayfqqlstrtsiillgdsimgcltmdagvpsvenilkigfl	250
Ac_cN3B	tvlkd-----teyfqqlctrtniillgdsimgclsmadgvadvknirigfl	250
.	: : : . : : * * * * * : : :	

Teil Motiv III

Os_cN3	nnniek--slkdyseafdivylndapmvgvvelvselcp-----	343
Ce_cN3	ngslddtaalqhyeevydivlihdptlnvaqkivdiinssh-----	423
Dm_cN3B	fdhvea--nmkkymdtfdivlvddqtmdivprtllsliekqhk-lnleapkgssl	319
Dr_cN3	ndkvee--llekymsynivlardetlevpnsilqkil-----	320
Xt_cN3A	ndkvee--liekymsydivlvkddtldvansviqkil-----	286
Gg_cN3A	ndkvde--llekymsydivlvkdeslevansilqkil-----	285
Ac_cN3A	ndkvee--llekymsydivlvkddsldvansilqkil-----	331
Mm_cN3A	ndrvde--llekymsydivlvkeeslevvnsilqktl-----	297
Hs_cN3A	ndrvde--llekymsydivlvqdeslevansilqkil-----	336
Xt_cN3B	ndkvde--lteqflqsydivlvrdetldvvnngllqyvtakn-----	290
Mm_cN3B	ndkvee--rrerymsydivlekedetldvvnngllrhilyqgdcelqgs-----	300
Hs_cN3B	ndkvee--rrerymsydivlekedetldvvnngllqhilcggvqlemqgp-----	300
Gg_cN3B	ndkvee--qrgryldaydivlesdetldvvnngilryilmet-----	289
Ac_cN3B	ndrvee--qrgkyiesydivlekedetldvangilnfilagnqstptlyp-----	297
::	: : : : * * : : : :	

Abb. 3 SDS-PAGE-Analyse der Überexpression der His₆-SUMO-D^mcN3B in *E. coli* sowie der Fraktionen der ersten Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie. In den ersten zwei Spuren wurde *E. coli*-Lysat vor und nach Induktion der Proteinexpression durch IPTG-Zugabe analysiert. Es ist eine deutliche Überexpression der His₆-SUMO-D^mcN3B zu erkennen. In der dritten Spur wurde die Proteinzusammensetzung der Pellet-Fraktion (Pt) getestet, die durch das Zentrifugieren nach dem Zellaufschluss entstand. Das Pellet wurde in 8 M Harnstoff-haltigem Puffer resuspendiert. Der Überstand (ÜS) der Zentrifugation ist in Spur 4 zu sehen. Dieser wurde anschließend auf eine Nickel-NTA-Agarose-Säule geladen. Der Durchfluss (DF), sowie die Waschfraktionen (W1-3) sind in den Spuren 5-8 zu sehen. In den Spuren 9-16 wurden die Elutionsfraktionen analysiert, die durch Zugabe steigender Konzentrationen an Imidazol zum Waschlösungsmittel entstanden. M, 6H-Marker (Invitrogen); Färbung durch Coomassie.

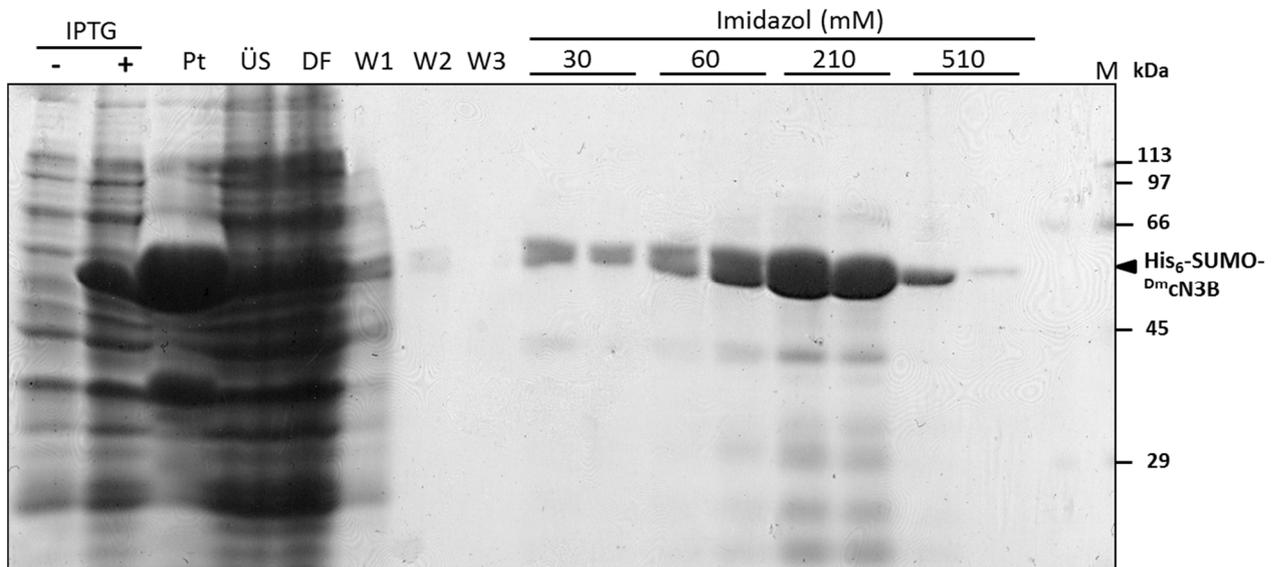


Abb. 4 Die proteolytische Spaltung der His₆-SUMO-D^mcN3B durch Zugabe von Ulp1-Protease und anschließende Reinigung über eine zweite Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie. Zu sehen ist ein Bild Gels einer SDS-PAGE mit folgenden Fraktionen: M, 6H-Marker (Invitrogen); Ulp1 -, vereinigte Fraktionen der ersten Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie; Ulp1 +, Dialysat mit Ulp1-Protease; DF, Durchfluss der zweiten Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie; E, Eluat der zweiten Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie. Färbung durch Coomassie.

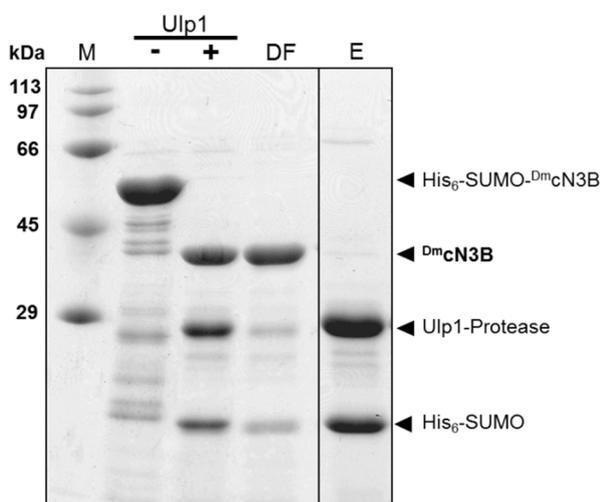


Abb. 5 Reinigung der Dm_cN3B durch eine Hydroxyapatit-Chromatographie. A) Scan eines Coomassie-gefärbten Gels einer SDS-PAGE zur Analyse der Fraktionen der Hydroxyapatit (HA)-Chromatographie. M, 6H-Marker (Invitrogen); L, *load* (entspricht der DF-Fraktion der zweiten Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie); DF, Durchfluss der HA-Chromatographie; 1-9, Elutionsfraktionen. **B)** Das UV-Spektrum der Dm_cNB nach Vereinigung der entsprechenden HA-Elutionsfraktionen (6-8). Zur Berechnung der Konzentration wurde für eine OD_{600} von 1 eine Konzentration von 1,66 mg/mL zugrunde gelegt (Protean®).

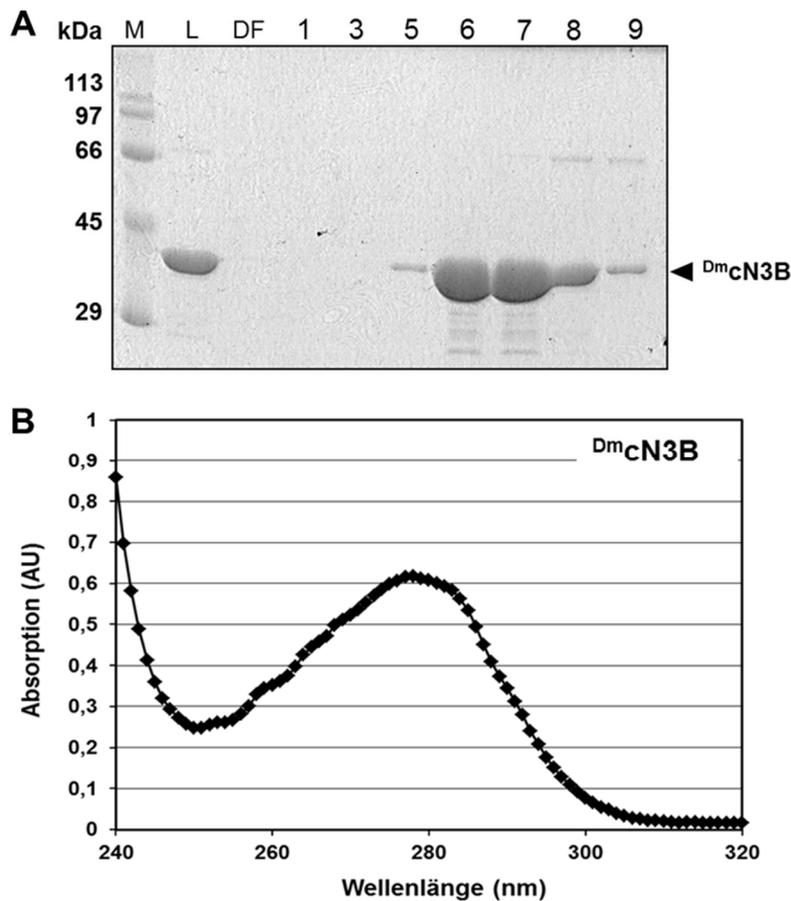


Abb. 6 Profillauf einer HPLC zur Bestimmung der Nucleotidkomposition einer Nucleotidextraktion aus *D.melanogaster*-Embryonen. Es wurden jeweils 50 µL des Extraktes auf eine C18-Säule (Supercosil) geladen und eine IP-RP-HPLC (LaChrom 7000) durchgeführt nach dem Protokoll von Gebelein et al. 1992. Die Retentionszeiten der einzelnen Nucleotide wurden durch Standardsubstanz validiert.

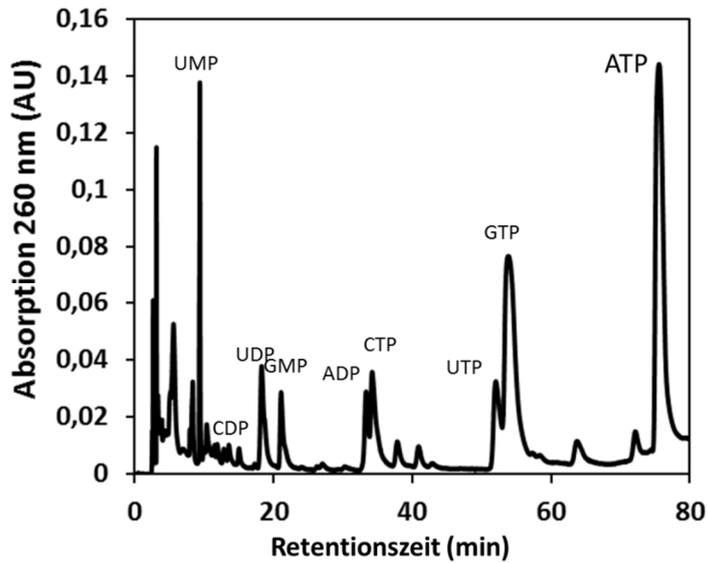


Abb. 7 Phosphateichkurve vom Malachitgrünolaltest.

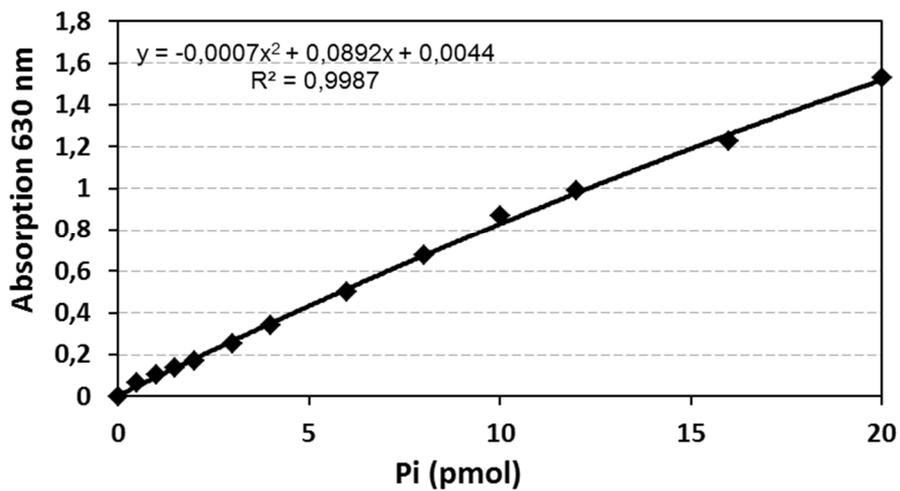
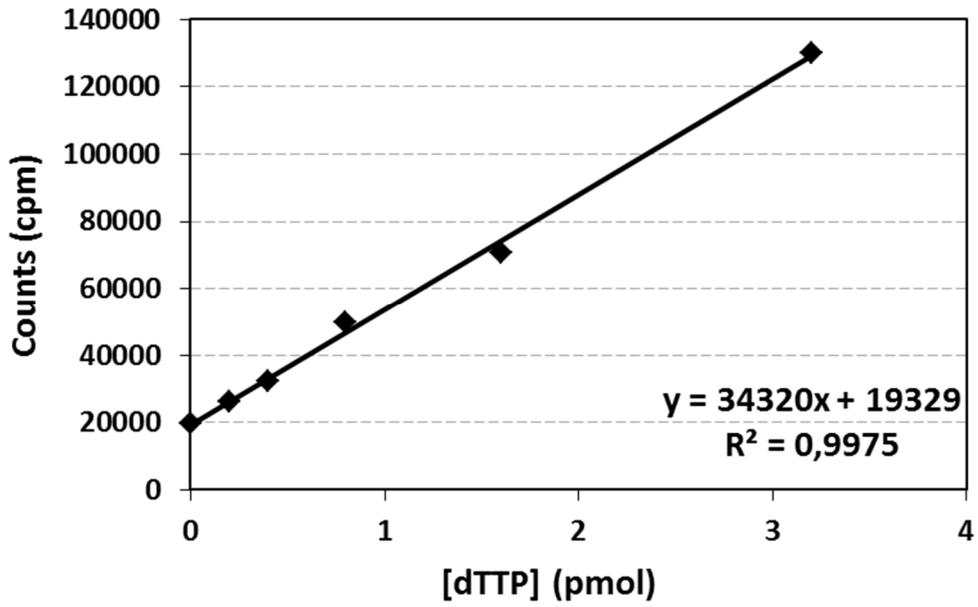


Abb. 8 Eichgerade zur Bestimmung der dTTP-Konzentration.



II. Tabellen

Tab. 1 Die 5'-Nukleotidasen in *D. melanogaster*. Alle Kandidaten einer Flybase-Datenbankanalyse (www.flybase.org), die mit einer 5'-Nukleotidase-Aktivität in Zusammenhang gebracht wurden.

Name	CG-Nummer	Familie	Transkriptexpression (0-6 h Embryo)	Aktivität
cN3B	CG3362	HAD	Moderat-moderat hoch	5'-NT
cN2	CG32549	HAD	Niedrig-moderat hoch	5'-NT
NT5E2	CG30104	Calcineurin-ähnlich	Sehr niedrig-niedrig	5'-NT
veil	CG4827	Calcineurin-ähnlich	Sehr niedrig-moderat	5'-NT
CG11883	CG11883	Calcineurin-ähnlich	Keine-niedrig	5'-NT
CG30103	CG30103	Calcineurin-ähnlich	Keine-sehr niedrig	keine 5'-NT
CG42249	CG42249	Calcineurin-ähnlich	keine	keine 5'-NT
CG2862	CG2862	HIT	Sehr hoch	Purinphosphoamidat- Abbau
CG7789	CG7789	Inositolmonophosphatase	Moderat-moderat hoch	Inositol-Abbau
CG1814	CG1814	HAD-ähnlich	Sehr niedrig-niedrig	keine Angaben
CG2277	CG2277	HAD-ähnlich	Moderat-moderat hoch	keine Angaben

Tab. 2 Transkriptexpressionslevel verschiedener Enzyme die am Nukleotidstoffwechsel beteiligt sind im Entwicklungszeitraum von 0-12 h der Embryogenese. Die Enzyme wurden in drei Gruppen unterteilt: Enzyme, die an der Nukleotidsynthese beteiligt sind, Enzyme, denen eine 5'-Nukleotidaseaktivität annotiert wurde und Enzyme, die am Nukleotidabbau beteiligt sind. Die Farbkodierung Blau-Weiß-Rot gibt die Höhe des Transkriptexpressionslevels an, so bedeutet dunkelblau keine Expression und rot starke Expression.

Kategorie	Name	Name in D. melanogaster	CG-Nummer	Embryoentwicklung (h)							
				0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12		
Synthese	Adenylosuccinat-Synthase	AdSS	CG17273	231	342	291	237	212	225		
	Adenylosuccinat-Lyase	AdSL	CG3590	52	14	21	32	34	37		
	IMP-Dehydrogenase	raspberry	CG1799	99	6	10	23	33	44		
	GMP-Synthase	burgundy	CG9242	110	112	49	41	50	37		
	Adenin-Phosphoribosyltransferase	APRT	CG18315	20	30	36	22	15	13		
	Adenylatkinase	adk2	CG3140	16	8	26	15	22	18		
		adk1	CG17146	8	8	5	5	6	8		
		adk3	CG6612	4	2	2	5	7	15		
	Adenosinkinase	AdenoK	CG11255	52	37	46	52	45	71		
	NDP-Kinasen	abnormal wing discs	CG2210	1577	1088	290	163	182	296		
		nmdyn-D6	CG5310	14	3	2	1	3	3		
		nmdyn-D7	CG8362	23	8	20	18	14	5		
	Guanylatkinase		CG11811	69	48	29	38	46	64		
	Aspartat-Carbamoyltransferase	rudimentary	CG18572	16	15	9	8	19	36		
	Dihydroorotat-Dehydrogenase	DHODH	CG9741	52	58	31	30	33	25		
	Orotat-Phosphoribosyltransferase/ OMP-Decarboxylase	rudimentary-like	CG3593	74	99	52	46	83	91		
	AMP-UMP-CMP-Kinase	Dak1	CG6092	56	43	41	52	52	51		
	CTP-Synthase	CTPsyn	CG45070	48	68	72	74	68	54		
	Uridin-Kinase	lethal (2)k01209	CG4798	25	26	28	27	27	22		
			CG6364	18	15	19	20	21	25		
	Uracil-Phosphoribosyltransferase		CG5537	92	106	75	79	85	88		
	dTMP-Kinase		CG5757	58	37	45	24	17	10		
	dUTP-Pyrophosphatase	dUTPase	CG4584	444	745	667	374	303	249		
	Thymidylat-Synthase	Ts	CG3181	84	17	40	32	18	13		
	Ribonukleotidreduktase	RnrS	CG8975	335	152	463	237	138	108		
		RnrL	CG5371	198	57	48	53	45	26		
	Desoxy nukleotid-Kinase	dnk	CG5452	252	207	248	157	120	95		
	Nukleotidasen	HAD-Nukleotidasen	cN2	CG32549	28	16	8	33	35	31	
			cN-IIIIB	CG3362	22	34	20	8	9	8	
		Calcium-abhängige Nukleotidasen	NT5E-2	CG30104	0	2	6	14	12	5	
veil			CG4827	1	13	24	6	3	3		
			CG5276	25	20	17	10	15	16		
			CG11883	9	0	0	0	0	1		
			CG30103	0	0	1	3	2	1		
			CG42249	0	0	0	0	1	0		
Abbau			AMP-Deaminase	AMPdeam	CG32626	24	3	1	2	2	2
			Adenosin-Deaminase	adgfa	CG5992	2	5	6	25	50	82
	Purinnukleosidphosphorylase 1	PNP1	CG16758	1	17	30	21	39	107		
	Purinnukleosidphosphorylase 2	PNP2	CG18128	0	0	0	0	0	0		
	Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase	Rosy	CG7642	1	13	11	5	4	4		
	Guanin-Deaminase	DhpD	CG18143	42	6	8	7	7	8		
	Uratoxidase	Uro	CG7171	0	1	0	0	0	0		
	Inosintriphosphat-Pyrophosphatase		CG8891	47	47	27	10	12	11		
	Dihydroorotat-Dehydrogenase	sur	CG2194	0	2	8	31	25	21		
	β-Ureidopropionase	pyd3	CG3027	2	11	22	31	29	32		
	Dihydropyrimidinase	CRMP	CG1411	1	2	2	11	23	66		
	Cytidin-Deaminase		CG8349	0	0	0	0	0	0		
			CG8353	3	11	16	14	18	11		
			CG8360	11	2	4	9	11	11		
	Cytosin-Deaminase		CG5292	28	23	13	13	14	15		
	dCMP-Deaminase		CG6951	14	20	9	10	9	8		
	Uridin-Phosphorylase		CG17224	1	2	6	10	19	47		
			CG3788	11	8	5	4	3	1		
			CG6330	16	15	24	47	35	34		
	Nukleosid-di/tri-phosphatase	NTPase	CG3059	58	92	81	50	42	42		
			CG5276	25	20	17	16	15	16		

Tab. 3 Verwendete Oligodesoxynukleotide zur Generierung der cDNAs verschiedener zytosolischer 5'-Nucleotidasen aus Mensch und Taufliede. Fwd, 5'-3'-Oligodesoxynukleotid; Rev, 3'-5'-Oligodesoxynukleotid (reverse komplement).

cDNA	RT-Oligodesoxynukleotid	PCR-Oligodesoxynukleotide
^{Dm} cN3B	gaattcgtgaactccctg	Fwd: aaaggtctcttggtatgggcttgacgagaag Rev: ttctcgagttataggagctctgcttg
^{Dm} cN2	ggaatggaatgttggatc	Fwd: aaaggtctcttggtatgcaggccacgcccag Rev: ttaagcttctagtcttcggaggcatc
^{Hs} cN2	cgttgttctctgtgagtcctg	Fwd: aaaggtctcatggttcaacctctggagtgatcg Rev: ttaagcttgggtgcttggggttttgg
^{Hs} cN3A	gagaggtcttctggag	Fwd: aaaggtctcttggtatgaggcccccgtcc Rev: ttctcgagttatagaatcttctgtaaaatag
^{Hs} cN3B	tggagcctgcgccttcag	Fwd: aaaggtctcttggtatggcagaggaggtgag Rev: ttctcgagtcaggggccttgcatc

Tab. 4 Verwendete Mutageneseoligodesoxynukleotide zur Generierung der ^{Dm}cN3B-Motiv S-Varianten. WT, Wildtyp FGWW. Fwd, 5'-3'-Oligodesoxynukleotid; Rev, 3'-5'-Oligodesoxynukleotid (reverse komplement).

Proteinvariante	Mutageneseoligodesoxynukleotide	Ausgangsplasmid
^{Dm} cN3B-FGWY	Fwd: gtacatgatcgagtggtataccaagtctggcgaactg Rev: cagttcgccagacttggtataccactcgatcatgtac	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-WT
^{Dm} cN3B-FNWW	Fwd: agtgccctccagttcaatatctcaacgcctg Rev: caggcgttgaagatattgaaactggaggcact	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-WT
^{Dm} cN3B-HGWW	Fwd: gcagtgcctccagtcacgggatcttcaacgcctg Rev: caggcgttgaagatccctgactggaggcactgc	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-WT
^{Dm} cN3B-HGWY	Fwd: gtacatgatcgagtggtataccaagtctggcgaactg Rev: cagttcgccagacttggtataccactcgatcatgtac	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-HGWW
^{Dm} cN3B-HNWW	Fwd: ggagcagtgccctccagtcacaatatctcaacgcctgcc Rev: ggcaggcgttgaagatattgtgactggaggcactgctcc	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-FGWY
^{Dm} cN3B-FNWW	Fwd: gtacatgatcgagtggtataccaagtctggcgaactg Rev: cagttcgccagacttggtataccactcgatcatgtac	pET-SUMOadapt- ^{Dm} cN3B-FNWW

Tab. 5 Expressionsbedingungen und Reinigungsschritte für die in *E. coli* erzeugten Proteine.

Protein	Medium	Expressionsbedingungen	Reinigungsschritte
^{Dm} cN3B	LB-Medium	4 h bei 25°C	2x Ni-NTA, 1x HA
^{Hs} cN3B	LB-Medium	4 h bei 25°C	2x Ni-NTA, 1x HA
^{Hs} cN3A	TB-Medium	5 h bei 14°C	2x Ni-NTA, 1x Heparin
^{Dm} cN2	M9-Medium	4 h bei 18°C	2x Ni-NTA, 1x MonoQ, 1x HA
^{Hs} cN2	TB-Medium	4 h bei 25°C	2x Ni-NTA, 1x MonoQ
^{Dm} cN3B-Mutanten	M9-Medium	4 h bei 25°C	2x Ni-NTA, 1x HA

TB (Terrific Broth)-Medium: 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 mL Glycerin in 900 mL Wasser, autoklavieren, anschließend mit 100 mL 0,17 KH₂PO₄ and 0,72 M K₂HPO₄ auf 1 L auffüllen

M9-Medium: 1xM9-Salze (12,8 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl), 2 mM MgSO₄, 0,4% Glucose, 0,1 mM CaCl₂

Tab. 6 Verwendete Antikörper mit ihrer entsprechenden Verdünnung und Angaben zum Hersteller. Den Verdünnungen der primären Antikörper wurden zur Verlängerung der Haltbarkeit noch 0,1% Natriumazid hinzugefügt und die Lösungen im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt.

Antikörper	Verdünnung in 1xTN-Tween bzw. 1xPBS	Hersteller
^{Dm} cN3B-Serum	1:2000, 5%BSA	Eurogentec
^{Dm} cN3B-affinitätsgereinigt	1:300, 5%BSA	-
^{Mm} Tubulin	1:10000, 5% Milchpulver	Sigma Aldrich
^{Rn} HRP	1:10000	GE Healthcare
^{Mm} HRP	1:10000	GE Healthcare
^{Mm} IRdye800	1:15000	Licor
^{Mm} IRdye680	1:15000	Licor
^{Rn} IRdye680	1:15000	Licor
^{Rn} Alexa488	1:500	Dianova

Tab. 7 Maximale Absorptionswellenlänge und Extinktionskoeffizienten verschiedener Nukleotidspezies. Information von Sigma Aldrich.

Nukleotide	Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Wellenlänge (nm)
A	15,0	259
C	8,7	271
G	14,1	252
U	9,8	262
T	9,5	267
I	12,3	249
m ⁷ G	9,8	258
X	9,3	277
FAD	9,0	377
FMN	10,0	267
NADH	14,4	260

Tab. 8 Oligodesoxynukleotide für die Bestimmung der dNTP-Konzentration. P_dNTP ist das Adapteroligodesoxynukleotid, das mit jedem ON-Oligodesoxynukleotid vor dem Assay hybridisiert wurde.

Name	Oligodesoxynukleotidsequenz
P_dNTP	CCGCCTCCACCGCC
ON_dATP	AAATAAATAAATAAATAAATGGCGGTGGAGGCGG
ON_dCTP	TTGTTTGTGTTGTTGTTGGGCGGTGGAGGCGG
ON_dGTP	TTTCTTCTTTCTTTCTTTGGGCGGTGGAGGCGG
ON_dTTP	TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG

A.2 Abkürzungen

A	Absorption
A.	Adult
aa	Aminosäure
Abd.	Abdominal
ADA	Adenosindeaminase
ADP	Adenosindiphosphat
(d)AMP	(Desoxy-)Adenosinmonophosphat
Ap ₄ A	Diadenosintetraphosphat
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintri-phosphat
AU	Arbitrary Units
Blast	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C.	<i>Caenorhabditis</i>
C1/2	Cap
CBC	<i>cap binding complex</i>
Cd	Cadmium
cdN	zytosolische desoxynukleotidspezifische 5'-Nukleotidase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDP	Cytidindiphosphat
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
CNT	<i>concentrative nucleoside transporters</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintri-phosphat
Cu	Kupfer
D.	<i>Drosophila/ Danio</i>
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
Dcp	<i>decapping protein</i>
DcpS	<i>scavenger decapping protein</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DEE	<i>Drosophila melanogaster</i> -Embryoextrakt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENT	<i>equilibrative nucleoside transporters</i>
FB	<i>flybase</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G.	<i>Gallus</i>
GDP	Guanosindiphosphat
(d)GMP	(Desoxy-)Guanosinmonophosphat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintri-phosphat
H.	<i>Homo</i>
HA	Hydroxyapatit
HAD	haloacid dehalogenese
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Hg	Quecksilber
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
kDa	Kilodalton

(d)IMP	(Desoxy-)Inosinmonophosphat
IP	<i>ion pair</i>
K_i	inhibitorische Konstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L1-3	1-3 instar Larve
LB	Luria Bertani
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
M.	<i>Mus</i>
m^7G	7-Methylguanosin
m^7GDP	N7-Methyl-5'-guanosindiphosphat
m^7GMP	N7-Methyl-5'-guanosinmonophosphat
m^7GTP	N7-Methyl-5'-guanosintriphosphat
Malph.	Malphigisch
Mg	Magnesium
Mm	<i>Mus musculus</i>
MMLV	moloney murine leukemia virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
Ns	Nukleosid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDP	Nukleosiddiphosphat
Ni	Nickel
NMP	Nukleosidmonophosphat
NT	Nukleotidase
NT5C	zytosolische 5'-Nukleotidase
NT5E	ektosolische 5'-Nukleotidase
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
P-5'-N	Pyrimidinspezifische 5'-Nukleotidase
Pb	Blei
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data base</i>
PEI	Polyethylenimin
Pi	Orthophosphat
PNP	Purinnukleosidphosphorylase
PPi	Pyrophosphat
ppN	Nukleosiddiphosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
Rib-1-P	Ribose-1-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	reverse Transkription
S2	Schneider 2
SCID	<i>sever combined immune deficiency</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Seq	Sequenz
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Th.	Thoraxial
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TN	Tris-NaCl-Puffer
tRNA	<i>transfer RNA</i>
(d)UMP	(Desoxy-)Uridinmonophosphat
UMPH	UMP-Hydrolase
X.	<i>Xenopus</i>
XRN	Exoribonuklease

A.3 Literaturverzeichnis

Aas, Per Arne; Otterlei, Marit; Falnes, Pål O.; Vågbo, Cathrine B.; Skorpen, Frank; Akbari, Mansour et al. (2003): Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. In: *Nature* 421 (6925), S. 859–863. DOI: 10.1038/nature01363.

Agris, Paul F. (2008): Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. In: *EMBO reports* 9 (7), S. 629–635. DOI: 10.1038/embor.2008.104.

Ali-Murthy, Zehra; Lott, Susan E.; Eisen, Michael B.; Kornberg, Thomas B. (2013): An essential role for zygotic expression in the pre-cellular *Drosophila* embryo. In: *PLoS genetics* 9 (4), S. e1003428. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003428.

Allegrini, S.; Scaloni, A.; Ferrara, L.; Pesi, R.; Pinna, P.; Sgarrella, F. et al. (2001): Bovine cytosolic 5'-nucleotidase acts through the formation of an aspartate 52-phosphoenzyme intermediate. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (36), S. 33526–33532. DOI: 10.1074/jbc.M104088200.

Allegrini, Simone; Scaloni, Andrea; Careddu, Maria Giovanna; Cuccu, Giovanna; D'Ambrosio, Chiara; Pesi, Rossana et al. (2004): Mechanistic studies on bovine cytosolic 5'-nucleotidase II, an enzyme belonging to the HAD superfamily. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 271 (23-24), S. 4881–4891. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04457.x.

Allen, Karen N.; Dunaway-Mariano, Debra (2004): Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. In: *Trends in biochemical sciences* 29 (9), S. 495–503. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.07.008.

Amici, A.; Ciccioli, K.; Naponelli, V.; Raffaelli, N.; Magni, G. (2005): Evidence for essential catalytic determinants for human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (14), S. 1613–1620. DOI: 10.1007/s00018-005-5135-y.

Amici, A.; Emanuelli, M.; Ferretti, E.; Raffaelli, N.; Ruggieri, S.; Magni, G. (1994): Homogeneous pyrimidine nucleotidase from human erythrocytes: enzymic and molecular properties. In: *The Biochemical journal* 304 (Pt 3), S. 987–992.

Amici, A.; Emanuelli, M.; Raffaelli, N.; Ruggieri, S.; Saccucci, F.; Magni, G. (2000): Human erythrocyte pyrimidine 5-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus inclusion formation in response to alpha-interferon. In: *Blood* 96 (4), S. 1596–1598.

Amici, Adolfo; Emanuelli, Monica; Magni, Giulio; Raffaelli, Nadia; Ruggieri, Silverio (1997): Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. In: *FEBS Letters* 419 (2-3), S. 263–267. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01464-6.

Amici, Adolfo; Magni, Giulio (2002): Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 397 (2), S. 184–190. DOI: 10.1006/abbi.2001.2676.

Anderson, J. S.; Parker, R. P. (1998): The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. In: *The EMBO journal* 17 (5), S. 1497–1506. DOI: 10.1093/emboj/17.5.1497.

Aronow, B.; Ullman, B. (1987): In situ regulation of mammalian CTP synthetase by allosteric inhibition. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (11), S. 5106–5112.

Asagoshi, Kenjiro; Terato, Hiroaki; Ohyama, Yoshihiko; Ide, Hiroshi (2002): Effects of a guanine-derived formamidopyrimidine lesion on DNA replication: translesion DNA synthesis, nucleotide insertion, and extension kinetics. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (17), S. 14589–14597. DOI: 10.1074/jbc.M200316200.

Atkinson, D. E.; Walton, G. M. (1967): Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. In: *The Journal of biological chemistry* 242 (13), S. 3239–3241.

- Auton, Matthew; Rösger, Jörg; Sinev, Mikhail; Holthausen, Luis Marcelo F.; Bolen, D. Wayne (2011): Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. In: *Biophysical chemistry* 159 (1), S. 90–99. DOI: 10.1016/j.bpc.2011.05.012.
- Banditelli, S.; Baiocchi, C.; Pesi, R.; Allegrini, S.; Turriani, M.; Ipata, P. L. et al. (1996): The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase; a purine analog phosphorylating enzyme. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 28 (6), S. 711–720.
- Barsotti, Catia; Pesi, Rossana; Giannecchini, Michela; Ipata, Piero L. (2005): Evidence for the involvement of cytosolic 5'-nucleotidase (cN-II) in the synthesis of guanine nucleotides from xanthosine. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (14), S. 13465–13469. DOI: 10.1074/jbc.M413347200.
- Bassett, Andrew R.; Liu, Ji-Long (2014): CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. In: *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 41 (1), S. 7–19. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.12.004.
- Baxter, Nicola J.; Blackburn, G. Michael; Marston, James P.; Hounslow, Andrea M.; Cliff, Matthew J.; Bermel, Wolfgang et al. (2008): Anionic charge is prioritized over geometry in aluminum and magnesium fluoride transition state analogs of phosphoryl transfer enzymes. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (12), S. 3952–3958. DOI: 10.1021/ja078000n.
- Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M. (1988): A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. In: *Analytical biochemistry* 171 (2), S. 266–270.
- Becker, J. L. (1978): Regulation of purine biosynthesis in cultured *Drosophila melanogaster* cells: I.-- Conditional activity of hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase and 5-nucleotidase. In: *Biochimie* 60 (6-7), S. 619–625.
- Bellen, Hugo J.; Levis, Robert W.; Liao, Guochun; He, Yuchun; Carlson, Joseph W.; Tsang, Garson et al. (2004): The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. In: *Genetics* 167 (2), S. 761–781. DOI: 10.1534/genetics.104.026427.
- Ben-Bassat, I.; Brok-Simoni, F.; Ramot, B. (1975): Complement-sensitive red cells in aplastic anemia. In: *Blood* 46 (3), S. 357–361.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Stryer, Lubert; Häcker, Bärbel (2011): Biochemie. Korr. Nachdr. der 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2922186&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Bevington, A.; Mundy, K. I.; Yates, A. J.; Kanis, J. A.; Russell, R. G.; Taylor, D. J. et al. (1986): A study of intracellular orthophosphate concentration in human muscle and erythrocytes by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and selective chemical assay. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 71 (6), S. 729–735.
- Bianchi, Vera; Spychala, Jozef (2003): Mammalian 5'-nucleotidases. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (47), S. 46195–46198. DOI: 10.1074/jbc.R300032200.
- Bitto, Eduard; Bingman, Craig A.; Wesenberg, Gary E.; McCoy, Jason G.; Phillips, George N. (2006): Structure of pyrimidine 5'-nucleotidase type 1. Insight into mechanism of action and inhibition during lead poisoning. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (29), S. 20521–20529. DOI: 10.1074/jbc.M602000200.
- Björklund, Mikael; Taipale, Minna; Varjosalo, Markku; Saharinen, Juha; Lahdenperä, Juhani; Taipale, Jussi (2006): Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. In: *Nature* 439 (7079), S. 1009–1013. DOI: 10.1038/nature04469.
- Bontemps, F.; van den Berghe, G.; Hers, H. G. (1983): Evidence for a substrate cycle between AMP and adenosine in isolated hepatocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (10), S. 2829–2833.

- Bontemps, F.; van den Berghe, G.; Hers, H. G. (1988): 5'-Nucleotidase activities in human erythrocytes. Identification of a purine 5'-nucleotidase stimulated by ATP and glycerate 2,3-bisphosphate. In: *The Biochemical journal* 250 (3), S. 687–696.
- Bosse-Doenecke, Eva; Weininger, Ulrich; Gopalswamy, Mohanraj; Balbach, Jochen; Knudsen, Sanne Møller; Rudolph, Rainer (2008): High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. In: *Protein Expr. Purif.* 58 (1), S. 114–121. DOI: 10.1016/j.pep.2007.10.012.
- Boysen, Gunnar; Pachkowski, Brian F.; Nakamura, Jun; Swenberg, James A. (2009): The formation and biological significance of N7-guanine adducts. In: *Mutation research* 678 (2), S. 76–94. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.05.006.
- Bretonnet, A. S.; Jordheim, L. P.; Dumontet, C.; Lancelin, J. M. (2005): Regulation and activity of cytosolic 5'-nucleotidase II. A bifunctional allosteric enzyme of the Haloacid Dehalogenase superfamily involved in cellular metabolism. In: *FEBS Letters* 579 (16), S. 3363–3368. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.05.014.
- Brüser, Antje; Kirchberger, Jürgen; Kloos, Marco; Sträter, Norbert; Schöneberg, Torsten (2012): Functional linkage of adenine nucleotide binding sites in mammalian muscle 6-phosphofructokinase. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (21), S. 17546–17553. DOI: 10.1074/jbc.M112.347153.
- Buckley, R. H.; Schiff, R. I.; Schiff, S. E.; Markert, M. L.; Williams, L. W.; Harville, T. O. et al. (1997): Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. In: *The Journal of pediatrics* 130 (3), S. 378–387.
- Burroughs, A. Maxwell; Allen, Karen N.; Dunaway-Mariano, Debra; Aravind, L. (2006): Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. In: *Journal of molecular biology* 361 (5), S. 1003–1034. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.049.
- Buschmann, Juliane (2010): Identifizierung und Charakterisierung einer m7GMP-spezifischen 5'-Nucleotidase. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale). Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Buschmann, Juliane; Moritz, Bodo; Jeske, Mandy; Lilie, Hauke; Schierhorn, Angelika; Wahle, Elmar (2013): Identification of Drosophila and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases. In: *J. Biol. Chem.* 288 (4), S. 2441–2451. DOI: 10.1074/jbc.M112.426700.
- Calero, Guillermo; Wilson, Kristin F.; Ly, Thi; Rios-Steiner, Jorge L.; Clardy, Jon C.; Cerione, Richard A. (2002): Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. In: *Nature structural biology* 9 (12), S. 912–917. DOI: 10.1038/nsb874.
- Careddu, Maria Giovanna; Allegrini, Simone; Pesi, Rossana; Camici, Marcella; Garcia-Gil, Mercedes; Tozzi, Maria Grazia (2008): Knockdown of cytosolic 5'-nucleotidase II (cN-II) reveals that its activity is essential for survival in astrocytoma cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1783 (8), S. 1529–1535. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.03.018.
- Cavaliere, Valeria; Bernardi, Fabio; Romani, Patrizia; Duchi, Serena; Gargiulo, Giuseppe (2008): Building up the Drosophila eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (8), S. 2061–2072. DOI: 10.1002/dvdy.21625.
- Chabes, Andrei; Georgieva, Bilyana; Domkin, Vladimir; Zhao, Xiaolan; Rothstein, Rodney; Thelander, Lars (2003): Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. In: *Cell* 112 (3), S. 391–401.
- Chernyakov, Irina; Whipple, Joseph M.; Kotelawala, Lakmal; Grayhack, Elizabeth J.; Phizicky, Eric M. (2008): Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. In: *Genes & development* 22 (10), S. 1369–1380. DOI: 10.1101/gad.1654308.

- Chiarelli, Laurent R.; Fermo, Elisa; Abrusci, Patrizia; Bianchi, Paola; Dellacasa, Chiara M.; Galizzi, Alessandro et al. (2006a): Two new mutations of the P5'N-1 gene found in Italian patients with hereditary hemolytic anemia: the molecular basis of the red cell enzyme disorder. In: *Haematologica* 91 (9), S. 1244–1247.
- Chiarelli, Laurent R.; Fermo, Elisa; Zanella, Alberto; Valentini, Giovanna (2006b): Hereditary erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: a biochemical, genetic and clinical overview. In: *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 11 (1), S. 67–72. DOI: 10.1080/10245330500276667.
- Chintapalli, Venkateswara R.; Wang, Jing; Dow, Julian A. T. (2007): Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. In: *Nat. Genet.* 39 (6), S. 715–720. DOI: 10.1038/ng2049.
- Cividini, Federico; Filoni, Daniela Nicole; Pesi, Rossana; Allegrini, Simone; Camici, Marcella; Tozzi, Maria Grazia (2015): IMP-GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1850 (7), S. 1354–1361. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.03.017.
- Cole, James L.; Lary, Jeffrey W.; P. Moody, Thomas; Laue, Thomas M. (2008): Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. In: *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, Bd. 84: Elsevier (Methods in Cell Biology), S. 143–179.
- Coller, Jeff; Parker, Roy (2004): Eukaryotic mRNA decapping. In: *Annual review of biochemistry* 73, S. 861–890. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074032.
- Collet, J. F.; Stroobant, V.; Pirard, M.; Delpierre, G.; van Schaftingen, E. (1998a): A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (23), S. 14107–14112.
- Collet, J. F.; van Schaftingen, E.; Stroobant, V. (1998b): A new family of phosphotransferases related to P-type ATPases. In: *Trends in biochemical sciences* 23 (8), S. 284.
- Corrons, Joan-Lluis Vives i. (2000): Chronic non-spherocytic haemolytic anaemia due to congenital pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. 25 years later. In: *Best Practice & Research Clinical Haematology* 13 (1), S. 103–118. DOI: 10.1053/beha.1999.0060.
- Couttet, P.; Fromont-Racine, M.; Steel, D.; Pictet, R.; Grange, T. (1997): Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (11), S. 5628–5633.
- Curbo, Sophie; Amiri, Marjan; Foroogh, Fariba; Johansson, Magnus; Karlsson, Anna (2003): The *Drosophila melanogaster* UMP-CMP kinase cDNA encodes an N-terminal mitochondrial import signal. In: *Biochemical and biophysical research communications* 311 (2), S. 440–445.
- Darè, E.; Zhang, L. H.; Jenssen, D.; Bianchi, V. (1995): Molecular analysis of mutations in the hprt gene of V79 hamster fibroblasts: effects of imbalances in the dCTP, dGTP and dTTP pools. In: *Journal of molecular biology* 252 (5), S. 514–521.
- Davidson, B. L.; Pashmforoush, M.; Kelley, W. N.; Palella, T. D. (1989): Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. The molecular defect in a patient with gout (HPRTAshville). In: *The Journal of biological chemistry* 264 (1), S. 520–525.
- Deutsch, Stephen I.; Long, Katrice D.; Rosse, Richard B.; Mastropaolo, John; Eller, Judy (2005): Hypothesized deficiency of guanine-based purines may contribute to abnormalities of neurodevelopment, neuromodulation, and neurotransmission in Lesch-Nyhan syndrome. In: *Clinical neuropharmacology* 28 (1), S. 28–37.
- Dumontet, C.; Bauchu, E. C.; Fabianowska, K.; Lepoivre, M.; Wyczechowska, D.; Bodin, F.; Rolland, M. O. (1999): Common resistance mechanisms to nucleoside analogues in variants of the human erythroleukemic line K562. In: *Advances in experimental medicine and biology* 457, S. 571–577.

- Dunin-Horkawicz, Stanislaw; Czerwoniec, Anna; Gajda, Michal J.; Feder, Marcin; Grosjean, Henri; Bujnicki, Janusz M. (2006): MODOMICS: a database of RNA modification pathways. In: *Nucleic acids research* 34 (Database issue), S. D145-9. DOI: 10.1093/nar/gkj084.
- Dzeja, Petras; Terzic, Andre (2009): Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. In: *International journal of molecular sciences* 10 (4), S. 1729–1772. DOI: 10.3390/ijms10041729.
- Elwi, Adam N.; Damaraju, Vijaya L.; Baldwin, Stephen A.; Young, James D.; Sawyer, Michael B.; Cass, Carol E. (2006): Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84 (6), S. 844–858. DOI: 10.1139/o06-198.
- Endrizzi, James A.; Kim, Hanseong; Anderson, Paul M.; Baldwin, Enoch P. (2005): Mechanisms of product feedback regulation and drug resistance in cytidine triphosphate synthetases from the structure of a CTP-inhibited complex. In: *Biochemistry* 44 (41), S. 13491–13499. DOI: 10.1021/bi051282o.
- Fabrega, Carme; Hausmann, Stéphane; Shen, Vincent; Shuman, Stewart; Lima, Christopher D. (2004): Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. In: *Molecular cell* 13 (1), S. 77–89.
- Fenckova, Michaela; Hobizalova, Radka; Fric, Zdenek Faltynek; Dolezal, Tomas (2011): Functional characterization of ecto-5'-nucleotidases and apyrases in *Drosophila melanogaster*. In: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (12), S. 956–967. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.09.005.
- Ferraro, Paola; Franzolin, Elisa; Pontarin, Giovanna; Reichard, Peter; Bianchi, Vera (2010): Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. In: *Nucleic acids research* 38 (6), S. e85. DOI: 10.1093/nar/gkp1141.
- Fisher, D. K.; Higgins, T. J. (1994): A sensitive, high-volume, colorimetric assay for protein phosphatases. In: *Pharm. Res.* 11 (5), S. 759–763.
- Foe, V. E.; Alberts, B. M. (1983): Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. In: *Journal of cell science* 61, S. 31–70.
- Fraser, M. J.; Ciszczon, T.; Elick, T.; Bauser, C. (1996): Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. In: *Insect molecular biology* 5 (2), S. 141–151.
- Fu, Rong; Ceballos-Picot, Irene; Torres, Rosa J.; Larovere, Laura E.; Yamada, Yasukazu; Nguyen, Khue V. et al. (2014): Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. In: *Brain : a journal of neurology* 137 (Pt 5), S. 1282–1303. DOI: 10.1093/brain/awt202.
- Galmarini, Carlos M.; Jordheim, Lars; Dumontet, Charles (2003a): Role of IMP-selective 5'-nucleotidase (cN-II) in hematological malignancies. In: *Leukemia & lymphoma* 44 (7), S. 1105–1111. DOI: 10.1080/1042819031000077142.
- Galmarini, Carlos María; Thomas, Xavier; Graham, Kathryn; El Jafaari, Assia; Cros, Emeline; Jordheim, Lars et al. (2003b): Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. In: *British journal of haematology* 122 (1), S. 53–60.
- Galy, Vincent; Mattaj, Iain W.; Askjaer, Peter (2003): *Caenorhabditis elegans* nucleoporins Nup93 and Nup205 determine the limit of nuclear pore complex size exclusion in vivo. In: *Molecular biology of the cell* 14 (12), S. 5104–5115. DOI: 10.1091/mbc.E03-04-0237.
- Garcia-Gil, M.; Pesi, R.; Perna, S.; Allegrini, S.; Giannecchini, M.; Camici, M.; Tozzi, M. G. (2003): 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. In: *Neuroscience* 117 (4), S. 811–820.
- Gazziola, C.; Ferraro, P.; Moras, M.; Reichard, P.; Bianchi, V. (2001): Cytosolic high K(m) 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (9), S. 6185–6190. DOI: 10.1074/jbc.M007623200.

- Gazziola, C.; Moras, M.; Ferraro, P.; Gallinaro, L.; Verin, R.; Rampazzo, C. et al. (1999): Induction of human high K(M) 5'-nucleotidase in cultured 293 cells. In: *Experimental cell research* 253 (2), S. 474–482. DOI: 10.1006/excr.1999.4681.
- Gebauer, Juliane; Schuster, Stefan; Figueiredo, Luís F. de; Kaleta, Christoph (2012): Detecting and investigating substrate cycles in a genome-scale human metabolic network. In: *The FEBS journal* 279 (17), S. 3192–3202. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08700.x.
- Gebelein, M.; Merdes, G.; Berger, M. R. (1992): Nucleotide preparation from cells and determination of nucleotides by ion-pair high-performance liquid chromatography. In: *Journal of chromatography* 577 (1), S. 146–150.
- Geladopoulos, T. P.; Sotiroidis, T. G.; Evangelopoulos, A. E. (1991): A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. In: *Analytical biochemistry* 192 (1), S. 112–116.
- Gon, Stéphanie; Napolitano, Rita; Rocha, Walter; Coulon, Stéphane; Fuchs, Robert P. (2011): Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (48), S. 19311–19316. DOI: 10.1073/pnas.1113664108.
- Gratz, Scott J.; Cummings, Alexander M.; Nguyen, Jennifer N.; Hamm, Danielle C.; Donohue, Laura K.; Harrison, Melissa M. et al. (2013): Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. In: *Genetics* 194 (4), S. 1029–1035. DOI: 10.1534/genetics.113.152710.
- Graveley, Brenton R.; Brooks, Angela N.; Carlson, Joseph W.; Duff, Michael O.; Landolin, Jane M.; Yang, Li et al. (2011): The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. In: *Nature* 471 (7339), S. 473–479. DOI: 10.1038/nature09715.
- Green, Michael Richard; Sambrook, Joseph (2012): Molecular cloning. A laboratory manual. 4. ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Greenberg, Marc M. (2012): The formamidopyrimidines: purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress. In: *Accounts of chemical research* 45 (4), S. 588–597. DOI: 10.1021/ar2002182.
- Grobosky, Christina L.; Lopez, Jennifer B.; Rennie, Sarahbeth; Skopelitis, Dionysus J.; Wiest, Amanda T.; Bingman, Craig A.; Bitto, Eduard (2012): Structural basis of substrate specificity and selectivity of murine cytosolic 5'-nucleotidase III. In: *Journal of molecular biology* 423 (4), S. 540–554. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.08.014.
- Grosjean, Henri; Crécy-Lagard, Valérie de; Marck, Christian (2010): Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. In: *FEBS Letters* 584 (2), S. 252–264. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.11.052.
- Gu, Meigang; Lima, Christopher D. (2005): Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. In: *Current opinion in structural biology* 15 (1), S. 99–106. DOI: 10.1016/j.sbi.2005.01.009.
- Guha, S. K.; Rose, Z. B. (1983): Role of inosine 5'-phosphate in activating glucose-bisphosphatase. In: *Biochemistry* 22 (6), S. 1356–1361.
- Håkansson, Pelle; Hofer, Anders; Thelander, Lars (2006): Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (12), S. 7834–7841. DOI: 10.1074/jbc.M512894200.
- Harrison, Melissa M.; Eisen, Michael B. (2015): Transcriptional Activation of the Zygotic Genome in *Drosophila*. In: *Current topics in developmental biology* 113, S. 85–112. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.028.
- Heck, H. D. (1971): Statistical theory of cooperative binding to proteins. The Hill equation and the binding potential. In: *Journal of the American Chemical Society* 93 (1), S. 23–29.

- Hein, Marco Y.; Hubner, Nina C.; Poser, Ina; Cox, Jürgen; Nagaraj, Nagarjuna; Toyoda, Yusuke et al. (2015): A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. In: *Cell* 163 (3), S. 712–723. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.053.
- Hendler, S.; Fürer, E.; Srinivasan, P. R. (1970): Synthesis and chemical properties of monomers and polymers containing 7-methylguanine and an investigation of their substrate or template properties for bacterial deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid polymerases. In: *Biochemistry* 9 (21), S. 4141–4153.
- Hirschhorn, R.; Nicknam, M. N.; Eng, F.; Yang, D. R.; Borkowsky, W. (1992): Novel deletion and a new missense mutation (Glu 217 Lys) at the catalytic site in two adenosine deaminase alleles of a patient with neonatal onset adenosine deaminase- severe combined immunodeficiency. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149 (9), S. 3107–3112.
- Hunsucker, Sally Anne; Mitchell, Beverly S.; Sychala, Jozef (2005): The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. In: *Pharmacology & therapeutics* 107 (1), S. 1–30. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.01.003.
- Ipata, P. L.; Balestri, F. (2013): The functional logic of cytosolic 5'-nucleotidases. In: *Current medicinal chemistry* 20 (34), S. 4205–4216.
- Ipata, Piero Luigi; Balestri, Francesco; Camici, Marcella; Tozzi, Maria Grazia (2011): Molecular mechanisms of nucleoside recycling in the brain. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1), S. 140–145. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.10.007.
- Ipata, Piero Luigi; Tozzi, Maria Grazia (2006): Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II). In: *Purinergic signalling* 2 (4), S. 669–675. DOI: 10.1007/s11302-006-9009-z.
- Itoh, R. (1981): Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. In: *Biochimica et biophysica acta* 657 (2), S. 402–410.
- Itoh, R. (1993): IMP-GMP 5'-nucleotidase. In: *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 105 (1), S. 13–19.
- Itoh, R.; Mitsui, A.; Tsushima, K. (1967): 5'-nucleotidase of chicken liver. In: *Biochimica et biophysica acta* 146 (1), S. 151–159.
- Itoh, R.; Yamada, K. (1991): Determination of cytoplasmic 5'-nucleotidase which preferentially hydrolyses 6-hydroxypurine nucleotides in pig, rat and human tissues by immunotitration. In: *The International journal of biochemistry* 23 (4), S. 461–465.
- Itoh, Roichi (2013): Enzymatic properties and physiological roles of cytosolic 5'-nucleotidase II. In: *Current medicinal chemistry* 20 (34), S. 4260–4284.
- Jenkins, Victoria K.; Timmons, Allison K.; McCall, Kimberly (2013): Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. In: *Trends in cell biology* 23 (11), S. 567–574. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.07.005.
- Jensen, Michael A.; Fukushima, Marilyn; Davis, Ronald W. (2010): DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. In: *PLoS one* 5 (6), S. e11024. DOI: 10.1371/journal.pone.0011024.
- Jeske, Mandy; Wahle, Elmar (2008): Chapter 6 Cell-Free Deadenylation Assays with Drosophila Embryo Extracts. In: *RNA Turnover in Eukaryotes: Nucleases, Pathways and Analysis of mRNA Decay*, Bd. 448: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 107–118.
- Johnson, D. H.; Edström, J. E.; Burnett, J. B.; Friedman, T. B. (1987): Cloning of a Drosophila melanogaster adenine phosphoribosyltransferase structural gene and deduced amino acid sequence of the enzyme. In: *Gene* 59 (1), S. 77–86.
- Jungermann, K.; Heilbronn, R.; Katz, N.; Sasse, D. (1982): The glucose/glucose-6-phosphate cycle in the periportal and perivenous zone of rat liver. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 123 (2), S. 429–436.

- Kandori, Kazuhiko; Miyagawa, Kaori; Ishikawa, Tatsuo (2004): Adsorption of immunoglobulin onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles. In: *Journal of colloid and interface science* 273 (2), S. 406–413. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.01.069.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 27–30.
- Kanehisa, Minoru; Goto, Susumu; Sato, Yoko; Kawashima, Masayuki; Furumichi, Miho; Tanabe, Mao (2014): Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), S. D199-205. DOI: 10.1093/nar/gkt1076.
- Kanno, Hitoshi; Takizawa, Takenori; Miwa, Shiro; Fujii, Hisaichi (2004): Molecular basis of Japanese variants of pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. In: *British journal of haematology* 126 (2), S. 265–271. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05029.x.
- Karnahl, U.; Wasternack, C. (1992): Half-life of cytoplasmic rRNA and tRNA, of plastid rRNA and of uridine nucleotides in heterotrophically and photoorganotrophically grown cells of *Euglena gracilis* and its apoplast mutant W3BUL. In: *The International journal of biochemistry* 24 (3), S. 493–497.
- Keller, P. M.; McKee, S. A.; Fyfe, J. A. (1985): Cytoplasmic 5'-nucleotidase catalyzes acyclovir phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (15), S. 8664–8667.
- King, Anne E.; Ackley, Michael A.; Cass, Carol E.; Young, James D.; Baldwin, Stephen A. (2006): Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. In: *Trends in pharmacological sciences* 27 (8), S. 416–425. DOI: 10.1016/j.tips.2006.06.004.
- Kolonin, M. G.; Finley, R. L. (2000): A role for cyclin J in the rapid nuclear division cycles of early *Drosophila* embryogenesis. In: *Developmental biology* 227 (2), S. 661–672. DOI: 10.1006/dbio.2000.9916.
- Kong, Wei; Engel, Karen; Wang, Joanne (2004): Mammalian nucleoside transporters. In: *Current drug metabolism* 5 (1), S. 63–84.
- Koonin, E. V.; Tatusov, R. L. (1994): Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. In: *Journal of molecular biology* 244 (1), S. 125–132. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1711.
- Krahn, J. M. (1996): Structure and Function of the Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase Glutamine Site and Communication with the Phosphoribosylpyrophosphate Site. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (26), S. 15549–15557. DOI: 10.1074/jbc.271.26.15549.
- Krenitsky, T. A.; Spector, T.; Hall, W. W. (1986): Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 247 (1), S. 108–119.
- Kriventseva, Evgenia V.; Tegenfeldt, Fredrik; Petty, Tom J.; Waterhouse, Robert M.; Simão, Felipe A.; Pozdnyakov, Igor A. et al. (2015): OrthoDB v8: update of the hierarchical catalog of orthologs and the underlying free software. In: *Nucleic acids research* 43 (Database issue), S. D250-6. DOI: 10.1093/nar/gku1220.
- Kulkarni, Sameer S.; Karlsson, Håkan K. R.; Szekeres, Ferenc; Chibalin, Alexander V.; Krook, Anna; Zierath, Juleen R. (2011): Suppression of 5'-nucleotidase enzymes promotes AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation and metabolism in human and mouse skeletal muscle. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (40), S. 34567–34574. DOI: 10.1074/jbc.M111.268292.
- Kumar, Dinesh; Abdulovic, Amy L.; Viberg, Jörgen; Nilsson, Anna Karin; Kunkel, Thomas A.; Chabes, Andrei (2011): Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. In: *Nucleic acids research* 39 (4), S. 1360–1371. DOI: 10.1093/nar/gkq829.
- Kunkel, Thomas A. (2004): DNA replication fidelity. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (17), S. 16895–16898. DOI: 10.1074/jbc.R400006200.
- Kunz, B. A.; Kohalmi, S. E.; Kunkel, T. A.; Mathews, C. K.; McIntosh, E. M.; Reidy, J. A. (1994): International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens.

Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. In: *Mutation research* 318 (1), S. 1–64.

Langley, Alexander R.; Smith, James C.; Stemple, Derek L.; Harvey, Steven A. (2014): New insights into the maternal to zygotic transition. In: *Development (Cambridge, England)* 141 (20), S. 3834–3841. DOI: 10.1242/dev.102368.

Larimer, F. W.; Stevens, A. (1990): Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'-----3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. In: *Gene* 95 (1), S. 85–90.

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.

Latini, S.; Pedata, F. (2001): Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. In: *Journal of neurochemistry* 79 (3), S. 463–484.

Laver, John D.; Marsolais, Alexander J.; Smibert, Craig A.; Lipshitz, Howard D. (2015): Regulation and Function of Maternal Gene Products During the Maternal-to-Zygotic Transition in Drosophila. In: *Current topics in developmental biology* 113, S. 43–84. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2015.06.007.

LAWLEY, P. D.; BROOKES, P. (1963): FURTHER STUDIES ON THE ALKYLATION OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR CONSTITUENT NUCLEOTIDES. In: *The Biochemical journal* 89, S. 127–138.

Li, Liang; Schaid, Daniel J.; Fridley, Brooke L.; Kalari, Krishna R.; Jenkins, Gregory D.; Abo, Ryan P. et al. (2012): Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in patients with non-small cell lung cancer. In: *Pharmacogenetics and genomics* 22 (2), S. 105–116. DOI: 10.1097/FPC.0b013e32834dd7e2.

Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R. D. (1997): DNA excision repair pathways. In: *Current opinion in genetics & development* 7 (2), S. 158–169.

Liu, H. (2002): The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. In: *The EMBO journal* 21 (17), S. 4699–4708. DOI: 10.1093/emboj/cdf448.

Liu, Hudan; Rodgers, Nancy D.; Jiao, Xinfu; Kiledjian, Megerditch (2002): The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. In: *The EMBO journal* 21 (17), S. 4699–4708.

López, Luis C.; Akman, Hasan O.; García-Cazorla, Angeles; Dorado, Beatriz; Martí, Ramón; Nishino, Ichizo et al. (2009): Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. In: *Human molecular genetics* 18 (4), S. 714–722. DOI: 10.1093/hmg/ddn401.

Lu, M. M.; Chen, F.; Gitler, A.; Li, J.; Jin, F.; Ma, X. K.; Epstein, J. A. (2000): Cloning and expression analysis of murine lupin, a member of a novel gene family that is conserved through evolution and associated with Lupus inclusions. In: *Development genes and evolution* 210 (10), S. 512–517. DOI: 10.1007/s004270050340.

Machnicka, Magdalena A.; Milanowska, Kaja; Osman Oglou, Okan; Purta, Elzbieta; Kurkowska, Malgorzata; Olchowik, Anna et al. (2013): MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), S. D262-7. DOI: 10.1093/nar/gks1007.

Madrid-Marina, V. (1990): Soluble "high Km" 5'-nucleotidase activity in human T- and B-lymphoblasts: isolation and some properties. In: *The International journal of biochemistry* 22 (11), S. 1283–1289.

Magni, Giulio; Amici, Adolfo; Orsomando, Giuseppe (2013): The enzymology of cytosolic pyrimidine 5'-nucleotidases: functional analysis and physiopathological implications. In: *Current medicinal chemistry* 20 (34), S. 4304–4316.

Mangravite, Lara M.; Badagnani, Ilaria; Giacomini, Kathleen M. (2003): Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. In: *European journal of pharmacology* 479 (1-3), S. 269–281.

- Margaritis, L. H.; Kafatos, F. C.; Petri, W. H. (1980): The eggshell of *Drosophila melanogaster*. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. In: *Journal of cell science* 43, S. 1–35.
- Marinaki, A. M.; Escuredo, E.; Duley, J. A.; Simmonds, H. A.; Amici, A.; Naponelli, V. et al. (2001): Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. In: *Blood* 97 (11), S. 3327–3332.
- Mathews, Christopher K. (2006): DNA precursor metabolism and genomic stability. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (9), S. 1300–1314. DOI: 10.1096/fj.06-5730rev.
- Mazzon, Cristina; Rampazzo, Chiara; Scaini, Maria Chiara; Gallinaro, Lisa; Karlsson, Anna; Meier, Chris et al. (2003): Cytosolic and mitochondrial deoxyribonucleotidases: activity with substrate analogs, inhibitors and implications for therapy. In: *Biochemical pharmacology* 66 (3), S. 471–479.
- McCreanor, G. M.; Harkness, R. A. (1995): Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: normal nicotinamide-adenine dinucleotide but reduced ATP concentrations that correlate with reduced poly(ADP-ribose) synthetase activity in HPRT-deficient lymphoblasts. In: *Journal of inherited metabolic disease* 18 (6), S. 737–747.
- McGaughey, G. B.; Gagné, M.; Rappé, A. K. (1998): pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (25), S. 15458–15463.
- Michaelis, Leonor; Menten, Maud Leonora; Johnson, Kenneth A.; Goody, Roger S. (2011): The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. In: *Biochemistry* 50 (39), S. 8264–8269. DOI: 10.1021/bi201284u.
- Monecke, Thomas; Buschmann, Juliane; Neumann, Piotr; Wahle, Elmar; Ficner, Ralf (2014): Crystal structures of the novel cytosolic 5'-nucleotidase IIIB explain its preference for m7GMP. In: *PLoS one* 9 (3), S. e90915. DOI: 10.1371/journal.pone.0090915.
- Morais, M. C.; Zhang, W.; Baker, A. S.; Zhang, G.; Dunaway-Mariano, D.; Allen, K. N. (2000): The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. In: *Biochemistry* 39 (34), S. 10385–10396.
- Mossessova, E.; Lima, C. D. (2000): Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. In: *Molecular cell* 5 (5), S. 865–876.
- Naito, Yoshitsugu; Tsushima, Keizo (1976): Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 438 (1), S. 159–168. DOI: 10.1016/0005-2744(76)90232-1.
- Neudorf, Malte (2013): Untersuchung der Substratspezifität der m7GMP-spezifischen Nucleotidase CG3362 durch kinetische Charakterisierung zweier Aminosäureaustauschmutanten. Bachelorarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale). Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Newsholme, E. A.; Arch, J. R.; Brooks, B.; Surholt, B. (1983): The role of substrate cycles in metabolic regulation. In: *Biochemical Society transactions* 11 (1), S. 52–56.
- Ogata, S.; Hayashi, Y.; Misumi, Y.; Ikehara, Y. (1990): Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. In: *Biochemistry* 29 (34), S. 7923–7927.
- Paglia, D. E.; Valentine, W. N. (1975): Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 250 (20), S. 7973–7979.
- Paglia, D. E.; Valentine, W. N.; Brockway, R. A. (1984): Identification of thymidine nucleotidase and deoxyribonucleotidase activities among normal isozymes of 5'-nucleotidase in human erythrocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (2), S. 588–592.

- Paglia, D. E.; Valentine, W. N.; Fink, K. (1977): Lead poisoning. Further observations on erythrocyte pyrimidine-nucleotidase deficiency and intracellular accumulation of pyrimidine nucleotides. In: *The Journal of clinical investigation* 60 (6), S. 1362–1366. DOI: 10.1172/JCI108896.
- Parker, Roy; Song, Haiwei (2004): The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2), S. 121–127. DOI: 10.1038/nsmb724.
- Parks, Annette L.; Cook, Kevin R.; Belvin, Marcia; Dompe, Nicholas A.; Fawcett, Robert; Huppert, Kari et al. (2004): Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. In: *Nature genetics* 36 (3), S. 288–292. DOI: 10.1038/ng1312.
- Pastor-Anglada, Marçal; Cano-Soldado, Pedro; Molina-Arcas, Míriam; Lostao, M. Pilar; Larráyoz, Ignacio; Martínez-Picado, Javier; Casado, F. Javier (2005): Cell entry and export of nucleoside analogues. In: *Virus research* 107 (2), S. 151–164. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.11.005.
- Pesi, R.; Baiocchi, C.; Tozzi, M. G.; Camici, M. (1996): Synergistic action of ADP and 2,3-bisphosphoglycerate on the modulation of cytosolic 5'-nucleotidase. In: *Biochimica et biophysica acta* 1294 (2), S. 191–194.
- Pesi, R.; Turriani, M.; Allegrini, S.; Scolozzi, C.; Camici, M.; Ipata, P. L.; Tozzi, M. G. (1994): The bifunctional cytosolic 5'-nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 312 (1), S. 75–80. DOI: 10.1006/abbi.1994.1282.
- Pesi, Rossana; Allegrini, Simone; Careddu, Maria Giovanna; Filoni, Daniela Nicole; Camici, Marcella; Tozzi, Maria Grazia (2010): Active and regulatory sites of cytosolic 5'-nucleotidase. In: *The FEBS journal* 277 (23), S. 4863–4872. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07891.x.
- Phizicky, Eric M.; Hopper, Anita K. (2010): tRNA biology charges to the front. In: *Genes & development* 24 (17), S. 1832–1860. DOI: 10.1101/gad.1956510.
- Pinto, R. M.; Canales, J.; Günther Sillero, M. A.; Sillero, A. (1986): Diadenosine tetraphosphate activates cytosol 5'-nucleotidase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 138 (1), S. 261–267.
- Poli, Jérôme; Tsaponina, Olga; Crabbé, Laure; Keszthelyi, Andrea; Pantesco, Véronique; Chabes, Andrei et al. (2012): dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. In: *The EMBO journal* 31 (4), S. 883–894. DOI: 10.1038/emboj.2011.470.
- Prinz, Heino (2010): Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. In: *Journal of chemical biology* 3 (1), S. 37–44. DOI: 10.1007/s12154-009-0029-3.
- Pushpavalli, Sreerangam N C V L; Sarkar, Arpita; Ramaiah, M. Janaki; Chowdhury, Debabani Roy; Bhadra, Utpal; Pal-Bhadra, Manika (2013): *Drosophila* MOF controls Checkpoint protein2 and regulates genomic stability during early embryogenesis. In: *BMC molecular biology* 14, S. 1. DOI: 10.1186/1471-2199-14-1.
- Rampazzo, C.; Gazzola, C.; Ferraro, P.; Gallinaro, L.; Johansson, M.; Reichard, P.; Bianchi, V. (1999): Human high-Km 5'-nucleotidase effects of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 261 (3), S. 689–697.
- Rana, Sandeep; Blowers, Elizabeth C.; Natarajan, Amarnath (2015): Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (1), S. 2–29. DOI: 10.1021/jm401994c.
- Reed, Michael C.; Lieb, Anna; Nijhout, H. Frederik (2010): The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32 (5), S. 422–429. DOI: 10.1002/bies.200900167.
- Rees, D. C.; Duley, J.; Simmonds, H. A.; Wonke, B.; Thein, S. L.; Clegg, J. B.; Weatherall, D. J. (1996): Interaction of hemoglobin E and pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. In: *Blood* 88 (7), S. 2761–2767.
- Reis M. J. (1934): Nucleotidase and its relation to the deamination of nucleotides in the heart and the muscles. In: *Bull Soc Chim Biol.* 1934 (16), S. 385–399.

- Rich, S. A.; Bose, M.; Tempst, P.; Rudofsky, U. H. (1996): Purification, microsequencing, and immunolocalization of p36, a new interferon-alpha-induced protein that is associated with human lupus inclusions. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (2), S. 1118–1126.
- Rinaldo-Matthis, Agnes; Rampazzo, Chiara; Reichard, Peter; Bianchi, Vera; Nordlund, Pär (2002): Crystal structure of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. In: *Nature structural biology* 9 (10), S. 779–787. DOI: 10.1038/nsb846.
- Royou, Anne; Macias, Hector; Sullivan, William (2005): The Drosophila Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. In: *Current biology : CB* 15 (4), S. 334–339. DOI: 10.1016/j.cub.2005.02.026.
- Ruszczynska, Katarzyna; Kamienska-Trela, Krystyna; Wojcik, Jacek; Stepinski, Janusz; Darzynkiewicz, Edward; Stolarski, Ryszard (2003): Charge distribution in 7-methylguanine regarding cation-pi interaction with protein factor eIF4E. In: *Biophysical journal* 85 (3), S. 1450–1456. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74577-9.
- Sala-Newby, G. B.; Freeman, N. V.; Skladanowski, A. C.; Newby, A. C. (2000): Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (16), S. 11666–11671.
- Sander, G.; Topp, H.; Heller-Schöch, G.; Wieland, J.; Schöch, G. (1986): Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as measure for the metabolism of each of the three major species of RNA. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 71 (4), S. 367–374.
- Sauer, Aisha Vanessa; Brigida, Immacolata; Carriglio, Nicola; Aiuti, Alessandro (2012): Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 265. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00265.
- Schier, Alexander F. (2007): The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5823), S. 406–407. DOI: 10.1126/science.1140693.
- Schmit, Anne-Catherine; Herzog, Etienne; Chabouté, Marie-Edith (2015): GIP/MZT1 proteins: Key players in centromere regulation. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (23), S. 3665–3666. DOI: 10.1080/15384101.2015.1112614.
- Schneider, I. (1972): Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 27 (2), S. 353–365.
- Sculley, D. G.; Dawson, P. A.; Emmerson, B. T.; Gordon, R. B. (1992): A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. In: *Human genetics* 90 (3), S. 195–207.
- Shah, Palak; He, Yu-Ying (2015): Molecular regulation of UV-induced DNA repair. In: *Photochemistry and photobiology* 91 (2), S. 254–264. DOI: 10.1111/php.12406.
- Sherman, P. A.; Fyfe, J. A. (1989): Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. In: *Analytical biochemistry* 180 (2), S. 222–226.
- Shuman, S. (2001): Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 66, S. 1–40.
- Sibon, O. C.; Kelkar, A.; Lemstra, W.; Theurkauf, W. E. (2000): DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in Drosophila embryos. In: *Nature cell biology* 2 (2), S. 90–95. DOI: 10.1038/35000041.
- Simmonds, H. A.; Fairbanks, L. D.; Morris, G. S.; Webster, D. R.; Harley, E. H. (1988): Altered erythrocyte nucleotide patterns are characteristic of inherited disorders of purine or pyrimidine metabolism. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 171 (2-3), S. 197–210.
- Song, Shiwei; Wheeler, Linda J.; Mathews, Christopher K. (2003): Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (45), S. 43893–43896. DOI: 10.1074/jbc.C300401200.

- Spychala, J.; Madrid-Marina, V.; Fox, I. H. (1988): High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (35), S. 18759–18765.
- Steller, H. (2008): Regulation of apoptosis in *Drosophila*. In: *Cell death and differentiation* 15 (7), S. 1132–1138. DOI: 10.1038/cdd.2008.50.
- Stillwell, W. G.; Glogowski, J.; Xu, H. X.; Wishnok, J. S.; Zavala, D.; Montes, G. et al. (1991): Urinary excretion of nitrate, N-nitrosoproline, 3-methyladenine, and 7-methylguanine in a Colombian population at high risk for stomach cancer. In: *Cancer research* 51 (1), S. 190–194.
- Sträter, Norbert (2006): Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. In: *Purinergic signalling* 2 (2), S. 343–350. DOI: 10.1007/s11302-006-9000-8.
- Sullivan, W.; Daily, D. R.; Fogarty, P.; Yook, K. J.; Pimpinelli, S. (1993): Delays in anaphase initiation occur in individual nuclei of the syncytial *Drosophila* embryo. In: *Molecular biology of the cell* 4 (9), S. 885–896.
- Sullivan, W.; Theurkauf, W. E. (1995): The cytoskeleton and morphogenesis of the early *Drosophila* embryo. In: *Current opinion in cell biology* 7 (1), S. 18–22.
- Sullivan, William; Ashburner, Michael; Hawley, R. Scott (Hg.) (2000): *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Swanson, M. S.; Angle, C. R.; Stohs, S. J.; Wu, S. T.; Salhany, J. M.; Eliot, R. S.; Markin, R. S. (1983): ³¹P NMR study of erythrocytes from a patient with hereditary pyrimidine-5'-nucleotidase deficiency. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (1), S. 169–172.
- Swanson, M. S.; Markin, R. S.; Stohs, S. J.; Angle, C. R. (1984): Identification of cytidine diphosphodiesterases in erythrocytes from a patient with pyrimidine nucleotidase deficiency. In: *Blood* 63 (3), S. 665–670.
- Takada, Saeko; Kelkar, Anju; Theurkauf, William E. (2003): *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. In: *Cell* 113 (1), S. 87–99.
- Tamae, Kazuyoshi; Kawai, Kazuaki; Yamasaki, Sayumi; Kawanami, Kiyoshi; Ikeda, Masato; Takahashi, Ken et al. (2009): Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. In: *Cancer science* 100 (4), S. 715–721.
- Tautz, D.; Renz, M. (1983): An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. In: *Analytical biochemistry* 132 (1), S. 14–19.
- Taverniti, Valerio; Séraphin, Bertrand (2015): Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. In: *Nucleic acids research* 43 (1), S. 482–492. DOI: 10.1093/nar/gku1251.
- Thibault, Stephen T.; Singer, Matthew A.; Miyazaki, Wesley Y.; Milash, Brett; Dompe, Nicholas A.; Singh, Carol M. et al. (2004): A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. In: *Nature genetics* 36 (3), S. 283–287. DOI: 10.1038/ng1314.
- Tomikawa, Chie; Yokogawa, Takashi; Kanai, Tamotsu; Hori, Hiroyuki (2010): N7-Methylguanine at position 46 (m7G46) in tRNA from *Thermus thermophilus* is required for cell viability at high temperatures through a tRNA modification network. In: *Nucleic acids research* 38 (3), S. 942–957. DOI: 10.1093/nar/gkp1059.
- Torrance, J. D.; Karabus, C. D.; Shnier, M.; Meltzer, M.; Katz, J.; Jenkins, T. (1977): Haemolytic anaemia due to erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. Report of the first South African family. In: *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 52 (17), S. 671–673.
- Towns, William L.; Begley, Thomas J. (2012): Transfer RNA methyltransferases and their corresponding modifications in budding yeast and humans: activities, predications, and potential roles in human health. In: *DNA and cell biology* 31 (4), S. 434–454. DOI: 10.1089/dna.2011.1437.

- Tozzi, M. G.; Camici, M.; Pesi, R.; Allegrini, S.; Sgarrella, F.; Ipata, P. L. (1991): Nucleoside phosphotransferase activity of human colon carcinoma cytosolic 5'-nucleotidase. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 291 (2), S. 212–217.
- Tozzi, M. G.; Pesi, R.; Allegrini, S. (2013): On the physiological role of cytosolic 5'-nucleotidase II (cN-II): pathological and therapeutical implications. In: *Current medicinal chemistry* 20 (34), S. 4285–4291.
- Tram, Uyen; Riggs, Blake; Sullivan, William (2001): Cleavage and Gastrulation in Drosophila Embryos. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Turriani, M.; Pesi, R.; Nardone, A.; Turchi, G.; Sgarrella, F.; Ipata, P. L.; Tozzi, M. G. (1994): Cytosolic 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase: a nucleoside analog activating enzyme? In: *Journal of biochemical toxicology* 9 (1), S. 51–57.
- Uhlenbeck, O. C. (1987): A small catalytic oligoribonucleotide. In: *Nature* 328 (6131), S. 596–600. DOI: 10.1038/328596a0.
- Valentine, W. N.; Fink, K.; Paglia, D. E.; Harris, S. R.; Adams, W. S. (1974): Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. In: *The Journal of clinical investigation* 54 (4), S. 866–879. DOI: 10.1172/JCI107826.
- van den Berghe, G.; van Pottelsberghe, C.; Hers, H. G. (1977): A kinetic study of the soluble 5'-nucleotidase of rat liver. In: *The Biochemical journal* 162 (3), S. 611–616.
- van Dijk, Erwin; Cougot, Nicolas; Meyer, Sylke; Babajko, Sylvie; Wahle, Elmar; Séraphin, Bertrand (2002): Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. In: *The EMBO journal* 21 (24), S. 6915–6924.
- van Dijk, Erwin; Le Hir, Hervé; Séraphin, Bertrand (2003): DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (21), S. 12081–12086. DOI: 10.1073/pnas.1635192100.
- Venkei, Zsolt; Przewloka, Marcin R.; Glover, David M. (2011): Drosophila Mis12 complex acts as a single functional unit essential for anaphase chromosome movement and a robust spindle assembly checkpoint. In: *Genetics* 187 (1), S. 131–140. DOI: 10.1534/genetics.110.119628.
- Verheyen, E.; Cooley, L. (1994): Looking at oogenesis. In: *Methods in cell biology* 44, S. 545–561.
- Vives-Corrons, J. L.; Montserrat-Costa, E.; Rozman, C. (1976): Hereditary hemolytic anemia with erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency in Spain. Clinical, biological and familial studies. In: *Human genetics* 34 (3), S. 285–292.
- Voet, Donald; Voet, Judith G. (2004): *Biochemistry*. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley.
- Walldén, Karin; Nordlund, Pär (2011): Structural basis for the allosteric regulation and substrate recognition of human cytosolic 5'-nucleotidase II. In: *Journal of molecular biology* 408 (4), S. 684–696. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.02.059.
- Walldén, Karin; Stenmark, Pål; Nyman, Tomas; Flodin, Susanne; Gräslund, Susanne; Loppnau, Peter et al. (2007): Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (24), S. 17828–17836. DOI: 10.1074/jbc.M700917200.
- Walther, Thomas; Novo, Maite; Rössger, Katrin; Létisse, Fabien; Loret, Marie-Odile; Portais, Jean-Charles; François, Jean-Marie (2010): Control of ATP homeostasis during the respiro-fermentative transition in yeast. In: *Molecular systems biology* 6, S. 344. DOI: 10.1038/msb.2009.100.
- Wang, Weiru; Cho, Ho S.; Kim, Rosalind; Jancarik, Jaru; Yokota, Hisao; Nguyen, Henry H. et al. (2002): Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic "snapshots" of intermediate states. In: *Journal of molecular biology* 319 (2), S. 421–431. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00324-8.

- Wang, Zuoren; Kiledjian, Megerditch (2001): Functional Link between the Mammalian Exosome and mRNA Decapping. In: *Cell* 107 (6), S. 751–762. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00592-X.
- Weiss, J. N. (1997): The Hill equation revisited: uses and misuses. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (11), S. 835–841.
- Worku, Y.; Newby, A. C. (1982): Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. In: *The Biochemical journal* 205 (3), S. 503–510.
- Wyatt, Michael D.; Pittman, Douglas L. (2006): Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. In: *Chemical research in toxicology* 19 (12), S. 1580–1594. DOI: 10.1021/tx060164e.
- Wypijewska, Anna; Bojarska, Elzbieta; Lukaszewicz, Maciej; Stepinski, Janusz; Jemielity, Jacek; Davis, Richard E.; Darzynkiewicz, Edward (2012): 7-methylguanosine diphosphate (m(7)GDP) is not hydrolyzed but strongly bound by decapping scavenger (Dcp5) enzymes and potently inhibits their activity. In: *Biochemistry* 51 (40), S. 8003–8013. DOI: 10.1021/bi300781g.
- Yegutkin, Gennady G. (2008): Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. In: *Biochimica et biophysica acta* 1783 (5), S. 673–694. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.
- Yokota, S.; Oka, J.; Ozasa, H.; Itoh, R. (1988): Immunocytochemical localization of cytosol 5'-nucleotidase in chicken liver. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 36 (8), S. 983–989.
- Yokoyama, H.; Mukae, N.; Sakahira, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. (2000): A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (17), S. 12978–12986.
- Young, James D.; Yao, Sylvia Y. M.; Baldwin, Jocelyn M.; Cass, Carol E.; Baldwin, Stephen A. (2013): The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. In: *Molecular aspects of medicine* 34 (2-3), S. 529–547. DOI: 10.1016/j.mam.2012.05.007.
- Yucel, J. K.; Marszalek, J. D.; McIntosh, J. R.; Goldstein, L. S.; Cleveland, D. W.; Philp, A. V. (2000): CENP-meta, an essential kinetochore kinesin required for the maintenance of metaphase chromosome alignment in *Drosophila*. In: *The Journal of cell biology* 150 (1), S. 1–11.
- Zabielska, Magdalena A.; Borkowski, Tomasz; Slominska, Ewa M.; Smolenski, Ryszard T. (2015): Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology. In: *Pharmacological reports : PR* 67 (4), S. 682–688. DOI: 10.1016/j.pharep.2015.04.007.
- Zanella, Alberto; Bianchi, Paola; Fermo, Elisa; Valentini, Giovanna (2006): Hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: from genetics to clinical manifestations. In: *British journal of haematology* 133 (2), S. 113–123. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.05992.x.
- Zimmermann, H. (1992): 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. In: *The Biochemical journal* 285 (Pt 2), S. 345–365.
- Zimmermann, H. (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (4-5), S. 299–309.
- Zimmermann, Herbert; Zebisch, Matthias; Sträter, Norbert (2012): Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. In: *Purinergic signalling* 8 (3), S. 437–502. DOI: 10.1007/s11302-012-9309-4.

A.4 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zu allererst bei Prof. Dr. Elmar Wahle bedanken. Zum einen dafür, dass er mir ermöglicht hat dieses doch immer größer gewordene Projekt in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten und zum anderen für seine wundervolle Art als Chef mich immer mit den richtigen Hinweisen auf Kurs zu halten.

Ein besonderer Dank geht auch an die Gutachter dieser Arbeit für das Lesen und das Erstellen der Gutachten.

Ich möchte mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Wahle bedanken, für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Ratschläge, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Insbesondere geht mein Dank an Dr. Claudia Temme und Michael Götze für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein großes Dankeschön geht auch an Marina Schulze, Gudrun Scholz und Cornelia Herrmann, ohne die der Laboralltag niemals so einfach zu händeln gewesen wäre. Bei Florian Kluge möchte ich mich für seinen Humor und seine Arbeitseifer bedanken; gerade letzteres hat das letzte Jahr sehr erträglich gemacht.

Ich möchte mich außerdem bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: bei Dr. Bodo Moritz, Dr. Mandy Jeske, PD Dr. Hauke Lilie, Dr. Angelika Schierhorn, Dr. Thomas Mönecke, Dr. Piotr Neumann, Dr. Thomas Rudolph, Dr. Christian Ihling, Dr. Ilona Born, Prof. Dr. Ralf Ficner, Prof. Dr. Gunter Reuter und besonders auch bei Matthias Walther, der mir gezeigt hat das Fliegen genetik doch ganz interessant sein kann.

Darüber hinaus möchte ich dem GRK1591 für die Möglichkeit meiner Teilnahme als assoziierter Promotionsstudent danken, sowie für die Möglichkeit größere Meetings besuchen zu können.

Bei Bianca Busch, Mathias Lorbeer, Clarissa Dühning, Christian Kaiser, Stephan Holzschuh und Florian Brandel möchte ich mich für die Motivations- und Hilfsbereitschaft während der letzten Jahre bedanken. Das gilt insbesondere auch für meine Doppelkopfveteranen. Ein großer Dank geht auch an Irmgard Bußer und Phuong Herzer, die mir beide in dunklen Stunden ein helles Licht waren.

Zu guter letzt möchte ich mich ganz herzlich bei Norman Friedrich und meiner Familie bedanken: Bei Norman bedanke ich mich dafür, dass er mir beigebracht hat auf eigenen Füßen zu stehen und mir gezeigt hat, wieviele Gesichter die Liebe haben kann. Meiner Familie danke ich für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Zuversicht in meine Fähigkeiten. Danke schön.

A.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), Februar 2016

Juliane Buschmann

A.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Juliane Buschmann
Geburtsdatum: 19.01.1986
Geburtsort: Arnstadt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Anschrift: Paracelsusstr. 2c, 06110 Halle (Saale)

Ausbildung:

2011 – heute Teilnahme am GRK1591/1592 als assoziierter Promotionsstudent
2010 –2013 Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2005 – 2010 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom Biochemiker (Note: 1,5)
2003 – 2005 Buchenberggymnasium in Erfurt
Abschluss: Abitur (Note: 1,5)
2002 – 2003 Bramecote College, Nottingham, Großbritannien
1996 – 2002 Neideck-Gymnasium in Arnstadt
1992 – 1996 Wilhelm Külz-Grundschule in Arnstadt

Halle (Saale), Februar 2016

Juliane Buschmann

A.7 Publikationsliste

Buschmann, Juliane; Moritz, Bodo; Jeske, Mandy; Lilie, Hauke; Schierhorn, Angelika; Wahle, Elmar (2013): Identification of Drosophila and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases. In: *J. Biol. Chem.* 288 (4), S. 2441–2451. DOI: 10.1074/jbc.M112.426700.

Monecke, Thomas; **Buschmann, Juliane**; Neumann, Piotr; Wahle, Elmar; Ficner, Ralf (2014): Crystal structures of the novel cytosolic 5'-nucleotidase IIIB explain its preference for m7GMP. In: *PloS one* 9 (3), S. e90915. DOI: 10.1371/journal.pone.0090915.