

Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Imke Peters
geboren am 14.02.1975 in Bergisch Gladbach

2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie (Institutsleiter: Prof. Dr. D. Manstein) der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit von Mai 2000 bis Oktober 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Alves angefertigt.

Tag der Promotion: 15.12.2003

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Alves danke ich für die „spontane“ Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die damit verbundene Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, außerdem für seine stete Gesprächsbereitschaft und Unterstützung, sowie für die musikalischen Fachsimpeleien.

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Petra Fritsche danke ich herzlich für ihre geduldige und kompetente Einarbeitung zu Anfang meiner Promotion, für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre nie müde werdende Bereitschaft zur Beantwortung meiner vielen Fragen und außerdem für vergnügliche Stunden und eine schöne Zeit im Institut.

Frau Rosi Kayßer danke ich aufrichtig dafür, daß sie stets für mich da war und zu mir hielt, für ihre technische Assistenz, als es knapp wurde, und vor allem für vergnügliche Stunden und eine schöne Zeit im Institut.

Herrn Rolf Mull-Grotefend danke ich für seine Hilfsbereitschaft, für die lustigen Stunden im Labor und in der Mensa und für die Ratschläge und Beantwortung meiner Fragen botanischer Art.

Allen weiteren Mitgliedern der Abteilungen Biophysikalische Chemie und Biochemisch-Biophysikalische Verfahren danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für jegliche Unterstützung, die ich bekam.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre immerwährende Unterstützung und dafür, daß sie mir den Weg bis hierhin ermöglichten.

Vor allem danke ich Thilo ... einfach für alles!

Veröffentlichte Posterabstracts

Alves, J., Gerschon, D., **Peters, I.**, Rosati, O. & Vennekohl, P. (2000)

Engineering of the *EcoRI* restriction endonuclease

Biol. Chem. **381**: 179

Alves, J., von Pall, S., **Peters, I.** & Vennekohl, P. (2001)

EcoRI restriction endonuclease goes monomeric or heterodimeric

Biol. Chem. **382**: 161

Alves, J., Küster, W. & **Peters, I.** (2003)

Changing the specificity of the *EcoRI* restriction endonuclease

Protein Science **12** (Suppl. 1): 35

Sonstige Tagungsbeiträge

Peters, I., Küster, W. & Alves, J. (2002)

Restriction endonuclease *EcoRI* on the way to a new recognition sequence

FASEB Summer Research Conference „Nucleic Acid Enzymes: Structures, Mechanisms & Novel Applications“, Saxtons River, Vermont USA

Abstract

Peters, Imke

Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist eines der am besten untersuchten Restriktionsenzyme vom Typ II. Sie erkennt hochspezifisch die Basensequenz GAATTC und spaltet diese in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen zwischen Guanin und Adenin. Die Erkennung erfolgt über ein sehr komplexes und redundantes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen und hydrophoben Kontakten.

Es wurden Aminosäureaustausche an den Positionen Met137, Arg200 und Arg203 mit dem Ziel durchgeführt, eine Veränderung der Sequenzspezifität in bezug auf das äußere Basenpaar der Erkennungssequenz (GC) zu erreichen. Met137 wurde durch Asn, Cys, Gln, Leu und Lys, Arg200 durch Lys und Tyr und Arg203 durch Lys ersetzt.

Bei den Untersuchungen zeigte bereits die Einzelmutante M137Q eine eindeutige Änderung der Spezifität, da sie je nach Sequenzkontext sowohl auf Oligonukleotid- als auch Plasmidsubstraten 5-Methylcytosin anstelle des Cytosins bevorzugte. Da die übrigen Mutanten an Met137 nur geringe Spaltaktivitäten zeigten, diente allein diese Einzelmutante als Ausgangsstruktur für Mehrfachmutanten.

Für die Mehrfachmutanten wurden die vier Mutationen M137Q, R200K, R200Y und R203K in sämtlichen Variationen kombiniert. Daraus resultierten Enzyme, die mit Ausnahme von M137Q/R203K einen starken Verlust an spezifischer Aktivität aufwiesen. Die Doppelmutante M137Q/R203K zeigte eine starke Neigung zu *Starspaltung*, was in einer erhöhten Relaxation der Kopplungsstringenz zwischen DNA-Erkennung und Katalyse begründet liegt, so daß eine Spaltung der DNA auch dann erfolgen kann, wenn mehr Kontakte als die zum GC-Basenpaar gestört sind.

Bei der Kombination der Doppelmutation M137Q/R203K mit R200Y wurde ein Enzym generiert, das zwar nahezu keine Spaltaktivität mehr besitzt, allerdings unter *Starbedingungen* zu einer Spaltung aller vier symmetrischen Sequenzvariationen um die zentralen AT-Basenpaare aktiviert werden konnte, wobei die Sequenz CAATTG mit deutlicher Bevorzugung gespalten wurde. Damit wurde für die Mutante M137Q/R200Y/R203K eine Veränderung der Sequenzspezifität erreicht.

Schlagwörter: *EcoRI*, Spezifitätsänderung, 5-Methylcytosin

Abstract

Peters, Imke

Changing the sequence specificity of restriction endonuclease *EcoRI*

EcoRI is one of the best studied restriction endonucleases of type II. It recognizes the palindromic DNA sequence GAATTC with high specificity and cleaves it between G and A in the presence of Mg²⁺ ions. This specific recognition is due to a highly complex and redundant network of hydrogen bonds, ionic and hydrophobic contacts.

In order to change the sequence specificity of the enzyme concerning the GC base pair at the end of the recognition sequence three amino acid residues (Met137, Arg200 and Arg203) were mutated. Met137 was replaced by Asn, Cys, Gln, Leu and Lys, Arg200 by Lys and Tyr and Arg203 by Lys.

Already the single mutation M137Q results in an obvious change of specificity, because of its preference for 5-methyl cytosine instead of cytosine during cleavage experiments with both oligodeoxynucleotide and plasmid substrates depending on the sequence context within the DNA. All other mutants at amino acid Met137 revealed a strong reduction of cleavage activity. Thus only the single mutant M137Q was used as a starting point for further mutations within one protein.

The four mutations M137Q, R200K, R200Y und R203K were combined with each other to form any variation possible in order to generate multiple mutants. Except for M137Q/R203K all mutants showed heavy loss of cleavage activity. The mutant M137Q/R203K revealed an increased ability to cleave star sites. In this case the stringent coupling of specific DNA recognition and catalysis is relaxed and the cleavage of DNA also takes place even if there are more interrupted DNA contacts than those to the GC base pair.

By combining the double mutation M137Q/R203K with R200Y an enzyme was created, that despite very low activity was able to cleave all four palindromic hexamer variations with a central AATT sequence at star conditions, whereas the sequence CAATTG was obviously preferred. Thus an alteration of sequence specificity was obtained for the triple mutant M137Q/R200Y/R203K.

Keywords: *EcoRI*, altered specificity, 5-methyl cytosine

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AGS	Angewandte Gentechnologie Systeme
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base(n)
BisAA	N,N-Methylen-bisacrylamid
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C-	Carboxyl-
CD	Circulardichroismus
cfu	<i>colony forming unit</i>
Chl	Chloramphenicol
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	1,4-Dithioerythriol
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
$\epsilon_{x \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient bei x nm
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
KAc	Kaliumacetat
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante
K_{ass}	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
KP _i	Kaliumphosphat
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
m	milli oder Meter
mA	Milliampère
5mC	5-Methylcytosin
μ	mikro
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M _R	Molekulargewicht
n	nano

N-	Amino-
NEB	New England Biolabs
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD _{x nm}	optische Dichte bei x nm
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PNK	T4-Polynukleotidkinase
Pu	Purinbase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Py	Pyrimidinbase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSS	<i>Transformation and Storage in the same Solution</i>
U	Unit
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichts
V	Volt
VIS	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
v. l. n. r.	von links nach rechts
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins. Mutanten werden benannt, indem an die auszutauschende Aminosäure mit anschließender Positionsnummer das Kürzel der eingeführten Aminosäure angehängt wird.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Restriktionsendonukleasen.....	1
1.2	Die Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	4
1.2.1	Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion	8
1.2.2	Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz und Kopplung zur Katalyse.....	9
1.2.3	Katalyse.....	13
1.3	Strukturvergleich von <i>EcoRI</i> mit anderen Restriktionsendonukleasen	14
1.4	Ziel der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	25
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	25
2.2.1	Bakterienstämme	25
2.2.2	Nährmedien	26
2.2.3	Plasmidvektoren	27
2.2.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	29
2.2.4.1	TSS-Methode (<i>Transformation and Storage in the same Solution</i>).....	29
2.2.4.2	Rubidiumchlorid-Methode	30
2.2.5	Transformation von Bakterienzellen.....	31
2.2.6	Lagerung von Bakterienzellen	31
2.2.7	Expressionstest	32
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.3.2	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	33
2.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.3.4	Modifikation von DNA (Dephosphorylierung/Phosphorylierung).....	35
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	36
2.3.6	Elektrophoretische Trennung von DNA	37
2.3.6.1	Agarosegel-Elektrophorese	37
2.3.6.2	Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese	38
2.3.7	Mutagenesestrategien zur Klonierung der <i>EcoRI</i> -Mutanten.....	39
2.3.7.1	<i>Gapped duplex</i> -Mutagenese	39

2.3.7.2	Klonierung von hybridisierten Oligonukleotiden	42
2.3.7.3	Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten.....	43
2.3.7.4	Mutageneseoligonukleotide	43
2.3.8	Klonierung des Plasmids pUCMunI	45
2.3.9	DNA-Sequenzierung	47
2.4	Proteinisolierung	47
2.4.1	Fermentation.....	47
2.4.2	Zellaufschluß.....	48
2.4.3	Chromatographische Verfahren	49
2.4.3.1	Affinitätschromatographie	49
2.4.3.2	Ionenaustauschchromatographie	50
2.4.4	Dialyse von Proteinlösungen.....	51
2.5	Charakterisierung der <i>Eco</i>RI-Mutanten	52
2.5.1	Konzentrationsbestimmung.....	52
2.5.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli	52
2.5.3	<i>Western blot</i> (Immunoblot)	54
2.5.4	Circular dichroismus-Spektroskopie	55
2.5.5	Bestimmung der Spaltaktivität mit λ -DNA	56
2.5.6	Spaltuntersuchungen mit Plasmiden	58
2.5.7	Spaltuntersuchungen mit Oligodesoxynukleotiden.....	58
2.5.7.1	Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden	60
2.5.7.2	Auswertung von Oligokinetiken nach Michaelis-Menten	61
2.5.8	Gelretardationsexperimente (<i>Mobility shift assay</i>)	62
2.5.8.1	Darstellung der PCR- <i>Shift</i> substrate.....	62
2.5.8.2	<i>Mobility shift assay</i>	63
2.5.9	Entwicklung eines Plasmid-Testsystems zur Untersuchung der Diskriminie- rung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz.....	65
2.5.9.1	Darstellung des Substrats pBR2Eco.....	65
2.5.9.2	Modifikation des Substrats pBR2Eco	66
2.5.9.3	Anwendung des Plasmid-Testsystems	67
3	Ergebnisse	68
3.1	Darstellung der <i>Eco</i>RI-Mutanten	69
3.2	Aufreinigung der <i>Eco</i>RI-Mutanten	74

3.3 CD-Spektren	77
3.4 Kinetische Charakterisierung der <i>EcoRI</i>-Mutanten	79
3.4.1 Einzelmutanten an der Position Met137	80
3.4.1.1 Spaltung von λ -DNA	81
3.4.1.2 Spaltung von Plasmiden	83
3.4.1.3 Spaltung von Oligonukleotiden.....	84
3.4.2 Einzel- und Mehrfachmutanten mit den Mutationen M137Q, R200K und R203K	86
3.4.2.1 Spaltung von λ -DNA	87
3.4.2.2 Spaltung von Plasmiden	91
3.4.2.3 Spaltung von Oligonukleotiden.....	94
3.4.3 Einzel- und Mehrfachmutanten mit den Mutationen M137Q, R200Y und R203K	95
3.4.3.1 Spaltung von λ -DNA	95
3.4.3.2 Spaltung von Plasmiden	96
3.4.3.3 Spaltung von Oligonukleotiden.....	96
3.4.4 Mutanten mit dem <i>MunI</i> -Aminosäuresequenzmotiv Ala-Gly-Arg.....	97
3.4.4.1 Spaltung von λ -DNA	98
3.4.4.2 Spaltung von Plasmiden	98
3.4.4.3 Spaltung von Oligonukleotiden.....	99
3.5 Untersuchung des Bindungsverhalten der <i>EcoRI</i>-Mutanten.....	99
3.5.1 Bindung an ein 174 bp-Fragment.....	99
3.5.2 Bindung an ein 468 bp-Fragment.....	103
3.5.3 Bindung an ein Oligonukleotid	105
3.6 Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutanten mit M137Q auf Substraten mit CpG-Methylierung bzw. CpG-methylierter Erkennungssequenz.....	107
3.6.1 Spaltung von Oligonukleotiden mit und ohne CpG-methylierter Erkennungssequenz.....	108
3.6.2 Untersuchung der Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und un- methylierter Erkennungssequenz mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“	114
3.6.2.1 Entwicklung des Plasmid-Testsystems „pBR2Eco“	114
3.6.2.2 Anwendung des Plasmid-Testsystems „pBR2Eco“	115
3.7 Untersuchung des Spaltverhaltens ausgewählter <i>EcoRI</i>-Mutanten auf DNA mit <i>MunI</i>-Erkennungssequenz.....	118

3.7.1	Spaltung des Oligonukleotids „MunI-AT“	119
3.7.2	Weitere Untersuchungen der Mutante M137Q/R200Y/R203K durch Spaltung des Plasmids pUCMunI	120
3.7.2.1	Darstellung des Substrats pUCMunI.....	120
3.7.2.2	Spaltung des Plasmids pUCMunI mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K.....	120
3.7.3	Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutante M137Q/R200Y/R203K auf Oligonukleotiden mit der Sequenz WAATTW (W = A oder T).....	122
4	Diskussion.....	123
4.1	Aminosäureaustausche an der Position Met137.....	123
4.1.1	Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutante M137Q mit methylierter DNA	129
4.2	Mehrfachmutanten zur Änderung der Sequenzspezifität.....	131
4.3	Ausblick.....	138
5	Zusammenfassung	140
6	Anhang	141
7	Literaturverzeichnis.....	142

1 Einleitung

1.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die kurze spezifische DNA-Sequenzen erkennen und in beiden Strängen die Phosphodiesterbindungen spalten. Sie kommen ubiquitär in prokaryotischen Organismen vor [Roberts & Halford, 1993] und sind Teile von Restriktions/Modifikationssystemen (R/M-Systeme). Sie können als primitives Immunsystem der Zellen angesehen werden [Wilson & Murray, 1991], denn sie dienen den Organismen zur intrazellulären Abwehr eindringender Fremd-DNA, die zum Beispiel durch Bakteriophagen in die Zelle eingebracht werden kann. Die Fremd-DNA wird dabei durch Spalten in Fragmente unschädlich gemacht. Die zelleigene DNA muß durch Modifikation vor dieser Restriktion geschützt werden. Diese Aufgabe übernimmt die korrespondierende Methyltransferase, die vergesellschaftet mit der Restriktionsendonuklease in der Zelle vorliegt. Sie erkennt die gleiche Sequenz wie die Endonuklease und methyliert sie. Dabei unterscheidet man zwei Klassen von Methyltransferasen danach, ob ein Ringkohlenstoffatom (C5-Methylcytosin) oder ein exozyklisches Stickstoffatom (N4-Methylcytosin, N6-Methyladenin) methyliert wird [Cheng, 1995-a; Cheng, 1995-b]. Erstmals beobachtet wurde das Auftreten von Restriktion und Modifikation von Luria und Human (1952). Die Aufklärung erfolgte durch Arber und Dussoix (1962).

Neben dem Abwehrmechanismus wird R/M-Systemen auch evolutionäre Bedeutung zugeschrieben, da die entstehenden Bruchstücke der Fremd-DNA leichter für eine homologe Rekombination zugänglich sind und in das Wirtsgenom eingebracht werden können als das gesamte Genom des Eindringlings [Eggleston & West, 1997].

R/M-Systeme werden aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, des Bedarfs an Cofaktoren, sowie der spezifischen DNA-Erkennung und -Spaltung in vier Klassen eingeteilt [Heitman, 1993; Pingoud & Jeltsch, 1997]. Die ersten drei (Typ I bis III) beruhen auf der ursprünglichen Klassifizierung nach Smith und Nathans (1973), wobei die Typen I und II im Laufe der Zeit wegen Entdeckung neuer Enzyme bzw. neuer Eigenschaften in Unterklassen unterteilt wurden. Die vierte Gruppe wurde erst kürzlich neu definiert [Roberts *et al.*, 2003-b]. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit benötigen alle Restriktionsendonukleasen für die Spaltung von DNA divalente Kationen, in der Regel Mg^{2+} -Ionen [Bickle & Krüger, 1993].

Zu den R/M-Systemen des Typs I gehören Proteine, die einen Enzymkomplex aus mehreren Untereinheiten bilden. In diesem Enzymkomplex sind die drei Funktionen eines R/M-Systems (Restriktion, Modifikation und Spezifität) durch die einzelnen Untereinheiten repräsentiert. Meist handelt es sich dabei um Pentamere der Zusammensetzung R_2M_2S [Dryden *et al.*, 2001]. Die Art der von dem Enzymkomplex katalysierten Reaktion ist abhängig von der Methylierung des Substrats. Bei Hemimethylierung erfolgt die Methylierung des unmodifizierten DNA-Strangs innerhalb der Erkennungssequenz, wobei S-Adenosylmethionin als Cofaktor benötigt und in allen bekannten Fällen ein N6-Methyladenin gebildet wird [Roberts *et al.*, 2003-b]. Ein unmethyliertes Substrat wird in großem Abstand zur spezifischen Sequenz an variabler Stelle unter Verbrauch von sowohl ATP als auch S-Adenosylmethionin gespalten. Die Erkennungssequenz ist asymmetrisch, unterbrochen und umfaßt meistens sieben Basenpaare [Bickle, 1993]. Inzwischen sind vier Untergruppen (A, B, C und D) von Typ I-Enzymen definiert und allgemein gebräuchlich [Titheradge *et al.*, 2001].

Bei R/M-Systemen des Typs II sind Restriktionsendonuklease und Methyltransferase zwei voneinander getrennte und unabhängige Enzyme. Die Methyltransferasen kommen normalerweise in monomerer Form vor und benötigen S-Adenosylmethionin als Cofaktor, um N4-Methylcytosin, C5-Methylcytosin oder N6-Methyladenin zu bilden. Die Restriktionsendonuklease tritt überwiegend als Homodimer auf, es sind allerdings auch Monomere und Tetramere bekannt [Roberts *et al.*, 2003-b]. Als Cofaktoren sind für die Spaltung neben wenigen Ausnahmen lediglich Mg^{2+} -Ionen erforderlich. Mittlerweile sind aufgrund des großen Interesses dieser Enzyme für die Molekularbiologie über 3500 Typ II-Restriktionsenzyme charakterisiert [Roberts *et al.*, 2003-a]. Zu den Hauptkriterien für die Klassifizierung der Enzyme als Typ II zählen, daß sie die DNA innerhalb oder nahe bei der Erkennungssequenz spalten und daß zur nukleolytischen Aktivität keine ATP-Hydrolyse erforderlich ist [Pingoud & Jeltsch, 2001]. Da allerdings zwischen dieser großen Menge an Enzymen eine breite Vielfalt vorherrscht und nicht alle Enzyme der orthodoxen, ursprünglichen und stark begrenzten Definition für Typ II-R/M-Systeme entsprechen [Pingoud & Jeltsch, 2001], wurde es notwendig, Untergruppen zu bilden, für die kürzlich eine neue Nomenklatur eingeführt wurde bzw. von denen einige neu definiert wurden [Roberts *et al.*, 2003-b]. So sind momentan die Subtypen A, B, C, E, F, G, H, M, P, S und T vorhanden. Einige Enzyme können nach dieser Nomenklatur als Grenzfall betrachtet und mehreren Unterklassen zugeordnet werden. Im folgenden sind die einzelnen Untergruppen näher erläutert:

- Typ IIP: In dieser Gruppe sind die Enzyme zu finden, die früher zu den orthodoxen bzw. ursprünglichen Typ II-Enzymen gehörten. Sie erkennen palindrome Sequenzen, die vier bis acht Basenpaare umfassen, und spalten innerhalb oder direkt neben diesen. Dabei entstehen entweder glatte Enden (*Blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (*Sticky ends*).
- Typ IIA: Zu dieser Gruppe werden alle Enzyme gezählt, die eine asymmetrische Erkennungssequenz besitzen. Der Ort der Spaltung, ob innerhalb oder außerhalb der spezifischen Sequenz, ist dabei nicht von Belang.
- Typ IIB: Enzyme dieser Gruppe spalten die DNA auf beiden Seiten der Erkennungssequenz in beiden Strängen.
- Typ IIC: Die in diese Gruppe eingeteilten Enzyme bestehen aus einem einzigen Polypeptid, das sowohl die Restriktions- als auch die Modifikationsdomäne beherbergt. Die Erkennungssequenz ist entweder symmetrisch oder asymmetrisch.
- Typ IIE: In dieser Gruppe sind Enzyme zu finden, die mit zwei Kopien der Erkennungssequenz wechselwirken, von denen die eine gespalten und die andere als allosterischer Effektor dient. Die spezifische Sequenz ist palindrom.
- Typ IIF: Enzyme dieser Gruppe sind ähnlich denen der Gruppe IIE. Sie wechselwirken ebenfalls mit zwei Kopien der Erkennungssequenz, spalten allerdings beide in einer konzertierten Reaktion.
- Typ IIG: Bei diesen Enzymen sind wie bei denen des Typs IIC die Restriktions- und Modifikationsdomäne in einem einzigen Polypeptid vereint. Sie können durch S-Adenosylmethionin entweder stimuliert oder inhibiert werden. Die Erkennungssequenz kann sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch sein.
- Typ IIH: Die Enzyme dieser Gruppe sind in ihrem genetischen Aufbau denen des Typs I ähnlich, verhalten sich biochemisch allerdings wie Typ II-Enzyme, weshalb eine Zuordnung zu dieser Gruppe erfolgt. Die Erkennungssequenz ist entweder symmetrisch oder asymmetrisch.
- Typ IIM: In dieser Gruppe sind Enzyme zu finden, die methylierte spezifische Sequenzen erkennen und an genau festgelegter Position spalten.
- Typ IIS: Dieser Gruppe werden alle Enzyme des Typs IIA zugeordnet, die die DNA außerhalb der Erkennungssequenz in mindestens einem Strang spalten. Die Erkennungssequenz bleibt nach der Spaltung erhalten. Es ist die erste Untergruppe der Typ II-Enzyme, die entdeckt wurde [Szybalski *et al.*, 1991].

- Typ IIT: Enzyme dieser Gruppe liegen als Heterodimere vor. Die Erkennungssequenz ist symmetrisch oder asymmetrisch.

Typ III-R/M-Systeme bestehen aus einem Enzymkomplex, der jeweils eine Untereinheit für die Restriktion und eine für die Modifikation enthält. Während die Modifikationsuntereinheit einzeln in Anwesenheit von S-Adenosylmethionin als Methyltransferase agiert und in nur einem Strang innerhalb der Erkennungssequenz ein Adenin an N6 methyliert [Dryden *et al.*, 2001], wird für die Spaltung der DNA die Kooperation beider Untereinheiten benötigt. Dabei ist ATP erforderlich und wird, entgegen der Interpretation früherer Arbeiten [Yuan *et al.*, 1980], hydrolysiert [Meisel *et al.*, 1995]. Die Erkennungssequenz ist asymmetrisch und die Spaltung findet etwa 25 bis 27 Basenpaare entfernt von dieser statt. Allerdings erfolgt eine Spaltung von DNA durch diese Typ III-Enzyme nur unter der Bedingung, daß die spezifische Sequenz zweimal und in inverser Orientierung auf dem DNA-Substrat vorhanden ist [Meisel *et al.*, 1992].

Der vierten Gruppe, den Typ IV-R/M-Systemen, werden seit der neuen Definition nach Roberts *et al.* (2003-b) Enzyme zugeordnet, die nur methylierte DNA spalten und darüber hinaus eine geringe Spezifität aufweisen. Die Erkennungssequenzen sind außer für das am besten untersuchte Enzym dieser Gruppe, *EcoKMc*rBC, noch nicht definiert. Dieses erkennt zwei Dinukleotide der allgemeinen Form RmC (R steht für die Purinbasen A oder G; mC steht für N4-Methylcytosin oder 5-Methylcytosin), die 40 bis 3000 Basen auf dem Substrat voneinander entfernt liegen können. Die Spaltung erfolgt im Abstand von etwa 30 Basenpaaren von einer der beiden spezifischen Sequenzen [Stewart *et al.*, 2000].

Neben der zentralen Bedeutung für die Molekularbiologie stellen Restriktionsenzyme, insbesondere des Typs II, Modellsysteme zur Betrachtung und Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen dar. Sie bieten die Möglichkeit, allgemeine Gesetzmäßigkeiten aus den Mechanismen von DNA-Erkennung, -Bindung und -Spaltung aufzustellen und abzuleiten.

1.2 Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* stammt aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*). Sie ist die erste Restriktionsendonuklease, die quantitativ isoliert wurde, und neben *EcoRV* das am besten untersuchte Typ II-Restriktionsenzym. Erstmals beschrieben wurde sie im Jahre 1972 [Hedgpeth *et al.*, 1972]. Die Aufklärung der Gen- und Aminosäuresequenz erfolgte neun Jahre später [Greene *et al.*, 1981; Newman *et al.*, 1981].

EcoRI besteht aus 276 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 31 kDa. Ihre katalytische Aktivität entfaltet sie als dimeres Enzym gleicher Untereinheiten [Alves *et al.*, 1982]. Darüber hinaus ist in Lösungen höherer Konzentration die Bildung von spaltaktiven Tetrameren [Modrich & Zabel, 1976], sowie inaktiven höheren Polymeren mit ausgeprägt schlechter Löslichkeit und Aggregationsneigung [Luke & Halford, 1985] bekannt. Die Löslichkeit des Enzyms kann sich zusätzlich durch einzelne Aminosäureaustausche verschlechtern [Fritz, 1991; Oelgeschläger, 1992; Engel, 1993; Grabowski, 1993].

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* gehört der Untergruppe IIP an. Sie erkennt spezifisch die palindrome Sequenz GAATTC und spaltet in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen das Phosphodiesterückgrat in beiden Strängen zwischen Guanin und Adenin [Hedgpeth *et al.*, 1972] (siehe Pfeil in Abbildung 1.1). Die korrespondierende *EcoRI*-Methylase erkennt trotz des Nichtvorhandenseins einer Sequenzhomologie mit der Restriktionsendonuklease die gleiche Sequenz und methyliert sie am exozyklischen N6-Atom des inneren Adenins [Dugaiczky *et al.*, 1974] (siehe „M“ in Abbildung 1.1).

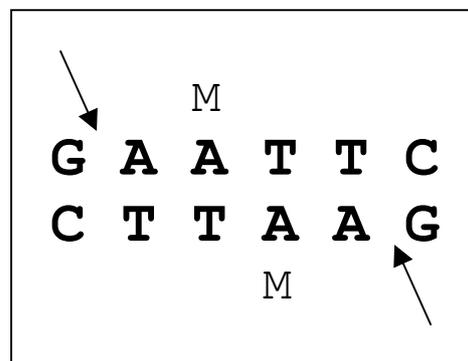


Abb. 1.1: Spaltung (Pfeil) und Modifikation (M) an der *EcoRI*-Erkennungssequenz durch *EcoRI*-Restriktionsendonuklease bzw. -Methylase

Diese Methylierung verhindert die vollständige Spaltung des Doppelstrangs [McClelland *et al.*, 1994]. Es können lediglich Einzelstrangbrüche durch sehr langsame Spaltung methylierter oder unspezifischer Sequenzen auftreten [Jen-Jacobson *et al.*, 1996], die jedoch durch die zelleigene Ligase leicht repariert werden und so keine Gefahr für den Organismus darstellen [Taylor *et al.*, 1990].

Neben der spezifischen Bindung ist *EcoRI* auch in der Lage, DNA anderer Sequenz unspezifisch zu binden. Diese Bindung ist der erste Schritt in einer Reihe von Aktionen, die letztendlich zur Spaltung der DNA führen. Es folgt eine eindimensionale lineare Diffusion entlang der großen Furche, während der die DNA nach der spezifischen Erkennungssequenz abgesucht wird [Ehbrecht *et al.*, 1985; Jeltsch *et al.*, 1994]. Die Erkennungssequenz wird

unter Standardbedingungen hochspezifisch erkannt und gebunden und nach Einleitung der Katalyse gespalten.

Unter bestimmten Pufferbedingungen (*Starbedingungen*) relaxiert die Spezifität des Enzyms. Es ist in der Lage, DNA-Sequenzen zu spalten, die in einem Basenpaar von der Erkennungssequenz abweichen (*Starsequenzen*). Diese *Starsequenzen* werden normalerweise (unter Standardbedingungen) mit bis zu 10^6 -fach geringerer Geschwindigkeit gespalten als die spezifische Sequenz [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Unter *Starbedingungen* erhöht sich ihre Spaltgeschwindigkeit etwa um den Faktor 10^3 , während die Spaltung der spezifischen Sequenz auf das Niveau der *Starspaltung* absinkt [Woodbury *et al.*, 1980; Rosenberg & Greene, 1982]. Erreicht werden diese relaxierenden Bedingungen zum Beispiel durch Austausch von Mg^{2+} -Ionen gegen Mn^{2+} -Ionen [Hsu & Berg, 1978], durch Zugabe organischer Lösungsmittel [Goodman *et al.*, 1977; Malyguine *et al.*, 1980] oder durch Erniedrigung der Ionenstärke bei gleichzeitiger Erhöhung des pH-Werts auf über 8,0 [Polisky *et al.*, 1975]. DNA-Sequenzen, die sich in mehr als einem Basenpaar unterscheiden, werden auch unter relaxierenden Bedingungen nicht mehr gespalten [Gardner *et al.*, 1982].

Beeinflusst wird die Spaltaktivität nicht nur von den Pufferbedingungen, sondern auch von der die spezifische Spaltstelle umgebenden DNA-Sequenz [Alves *et al.*, 1984; Van Cleve & Gumport, 1992; Windolph *et al.*, 1997-b]. So konnte mit dem Substrat λ -DNA gezeigt werden, daß die darauf befindlichen fünf Spaltstellen unterschiedlich schnell von *EcoRI* gespalten werden [Thomas & Davis, 1975; Halford *et al.*, 1980].

Die erste Röntgenstruktur von *EcoRI* wurde 1986 im Komplex mit dem spezifischen Oligonukleotid d(TCGCGAATTCGCG) veröffentlicht [McClarin *et al.*, 1986]. Diese wurde jedoch von Kim *et al.* (1990) nach Analyse weiterer Schwermetallderivate bei höherer Auflösung korrigiert. Eine detaillierte Beschreibung und Diskussion der Struktur wurde von Rosenberg (1991) durchgeführt.

Die beiden *EcoRI*-Untereinheiten bilden als Dimer eine globuläre Struktur mit einem Durchmesser von etwa 5 nm. Die DNA wird von dem Enzym mit armähnlichen Strukturen, die als *Inner arm* (Aminosäuren 124 bis 136) und *Outer arm* (Aminosäuren 176 bis 193) bezeichnet werden, umschlossen (siehe Abbildung 1.2). Dabei erfährt die DNA eine ausgeprägte Konformationsänderung. Ein Knick von etwa 30° wird in der Mitte der Erkennungssequenz induziert und die DNA um etwa 28° entwunden, wodurch die dem Protein zugewandte große Furche um etwa 3,5 Å geweitet wird [McClarin *et al.*, 1986; Rosenberg, 1991]. So wird pro Untereinheit die Einlagerung von je zwei α -Helices ($\alpha 4$ und $\alpha 5$) und einem ausgestreckten Abschnitt der Polypeptidkette, dem hauptsächlich für die

Erkennung der Basensequenz verantwortlichen *Extended chain* (Aminosäuren 137 bis 142), in die große Furche ermöglicht. Die kleine Furche ist dem Lösungsmittel zugewandt.

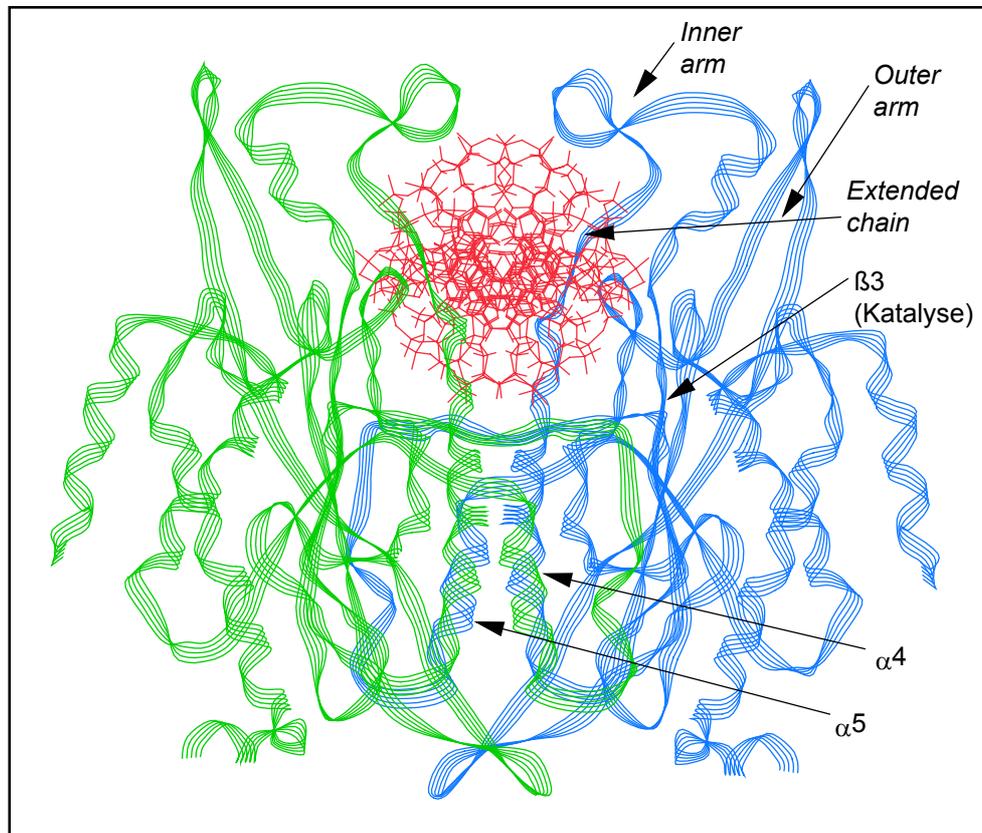


Abb. 1.2: Strukturmodell der Restriktionsendonuklease *EcoRI* im Komplex mit DNA (Ansicht entlang der DNA-Achse)

Das zentrale Strukturmotiv einer *EcoRI*-Untereinheit setzt sich aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt und vier α -Helices zusammen (siehe Abbildungen 1.3 und 1.7). Die ersten drei Faltblätter β_1 , β_2 und β_3 sind antiparallel angeordnet und enthalten die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren Asp91, Glu111 und Lys113. Die Stränge β_3 , β_4 und β_5 verlaufen parallel. Sie bilden mit den Helices α_4 und α_5 ein Faltblatt-*Turn*-Helix-Motiv, welches der Rossman-Falte, einem in vielen Dehydrogenasen vorkommenden Nukleotidbindungsmotiv, ähnelt [Rossman *et al.*, 1975]. Die Helices α_4 und α_5 , auch innere bzw. äußere Erkennungshelix genannt, bilden mit den entsprechenden Helices der zweiten Untereinheit ein Vier-Helix-Bündel, das weit in die große Furche hineinreicht. Vor diesem Helix-Bündel, also am N-terminalen Ende der Helix α_4 , befindet sich das *Extended chain*-Motiv (Aminosäuren 137 bis 142). Es stellt das Haupterkennungsmotiv der *EcoRI* dar und ist im Komplex mit der DNA nahezu parallel zur Helixachse angeordnet, wo es spezifische Wechselwirkungen zu Purin- und Pyrimidinbasen der Erkennungssequenz ausbilden kann (siehe Abbildung 1.4).

Sein anderes Ende (C-terminal) ist durch den *Inner arm* (Aminosäuren 124 bis 136) fixiert. Neben dem *Extended chain*-Motiv bilden auch die beiden Erkennungshelices α^4 und α^5 eine Vielzahl von Wechselwirkungen in Form von van der Waals- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen der spezifischen Sequenz und zu Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats aus.

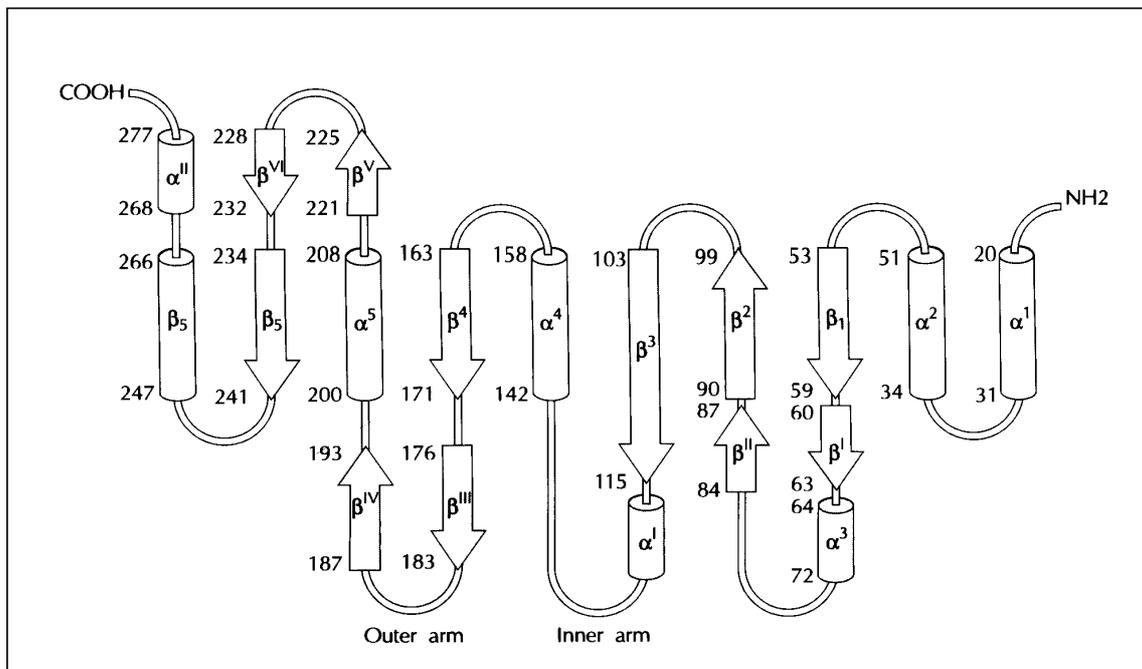


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Strukturanteile der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (nach Rosenberg, 1991)

Ein weiteres Strukturmotiv ist die sogenannte β -*Bridge*, bestehend aus den antiparallelen Faltblättern β^I und β^{II} , sowie der Helix α^3 und dem sie verbindenden *Loop*. Sie stellt im aktiven Homodimer über die Aminosäuren Ile73 und Asn85 eine Verbindung zur zweiten Untereinheit her.

1.2.1 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion

Eine Restriktionsendonuklease muß aufgrund ihrer biologischen Funktion als Abwehrmechanismus des Organismus eindringende Fremd-DNA effizient und schnell spalten, bevor die zelleigene Methylase die DNA modifiziert und sie damit vor Restriktion schützt. Dies erfordert eine schnelle Erkennung der spezifischen Sequenz, die neben einer Vielzahl unspezifischer Sequenzen in einem Verhältnis von 1:4095 deutlich unterrepräsentiert vorliegt. Dazu bindet die Restriktionsendonuklease *EcoRI* zunächst in einem diffusionskontrollierten Vorgang unspezifisch und an beliebiger Stelle an die DNA und sucht diese anschließend

entlang den Windungen der großen Furche in eindimensionaler linearer Diffusion mit einer Geschwindigkeit von 7×10^6 Basenpaaren pro Sekunde nach der Erkennungssequenz ab [Woodhead & Malcom, 1980; Ehbrecht *et al.*, 1985; Jeltsch *et al.*, 1994]. So können während eines Bindungsereignisses mehrere Tausend Basenpaare untersucht werden. Erreicht *EcoRI* eine *Star*sequenz, pausiert sie auf dieser bis zu 20 Sekunden [Jeltsch *et al.*, 1994], da diese deutlich fester gebunden wird als unspezifische DNA [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Zu einer Spaltung kommt es dabei in den meisten Fällen nicht.

Die unspezifische Bindung ist mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{ass}} \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$ [Langowski *et al.*, 1980; Terry *et al.*, 1985] schwach im Gegensatz zur spezifischen Bindung ($K_{\text{ass}} \approx 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [Grabowski *et al.*, 1995]). Sie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und ist damit von der Ionenstärke der umgebenden Lösung abhängig [Alves *et al.*, 1989-b].

1.2.2 Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz und Kopplung zur Katalyse

Hat die Restriktionsendonuklease *EcoRI* nach unspezifischer Bindung und linearer Diffusion entlang der DNA ihre Erkennungssequenz gefunden, werden eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen ihr und der DNA aufgebaut, worin sich die hohe Spezifität der Restriktionsendonukleasen begründet. Diese Wechselwirkungen zur spezifischen Sequenz unterscheiden sich sowohl in der Quantität als auch in der Qualität von denen zu unspezifischer DNA. Dabei handelt es sich um Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Bindungen, sowie ionische Kontakte (siehe Abbildung 1.4). Der Aufbau dieser Bindungen wird als Erkennung bezeichnet. Darüber hinaus schließt der Vorgang der Erkennung ebenfalls den Übergang vom unspezifischen in den spezifischen Protein-DNA-Komplex und die Aktivierung des katalytischen Zentrums mit ein. Durch Variation der Pufferbedingungen, Aminosäuremutationen oder verschiedene Cofaktoren kann die Substraterkennung bzw. die Katalyse beeinflusst werden.

Nach Rosenberg (1991) bildet *EcoRI* über die Aminosäuren Ala138, Asn141, Ala142, Arg145, Arg200 und Arg203 insgesamt 18 Wasserstoffbrückenbindungen zu ihrer Erkennungssequenz aus, von denen 14 zu Purinbasen und vier zu Pyrimidinbasen führen. Der Kontakt zum Guanin erfolgt dabei indirekt über ein zwischengelagertes Wassermolekül durch die Aminosäuren Arg200 und Arg203. Van der Waals-Wechselwirkungen zu den Pyrimidinbasen gehen von den Aminosäuren Gln115, Met137, Gly140 und Ala142 aus. Zusätzlich werden mehrere spezifische Kontakte zum Phosphatrückgrat der DNA geformt,

sowohl innerhalb der Erkennungssequenz als auch außerhalb dieser vom *Inner* und *Outer arm*. Abbildung 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der von *EcoRI* gebildeten Kontakte zur spezifischen DNA.

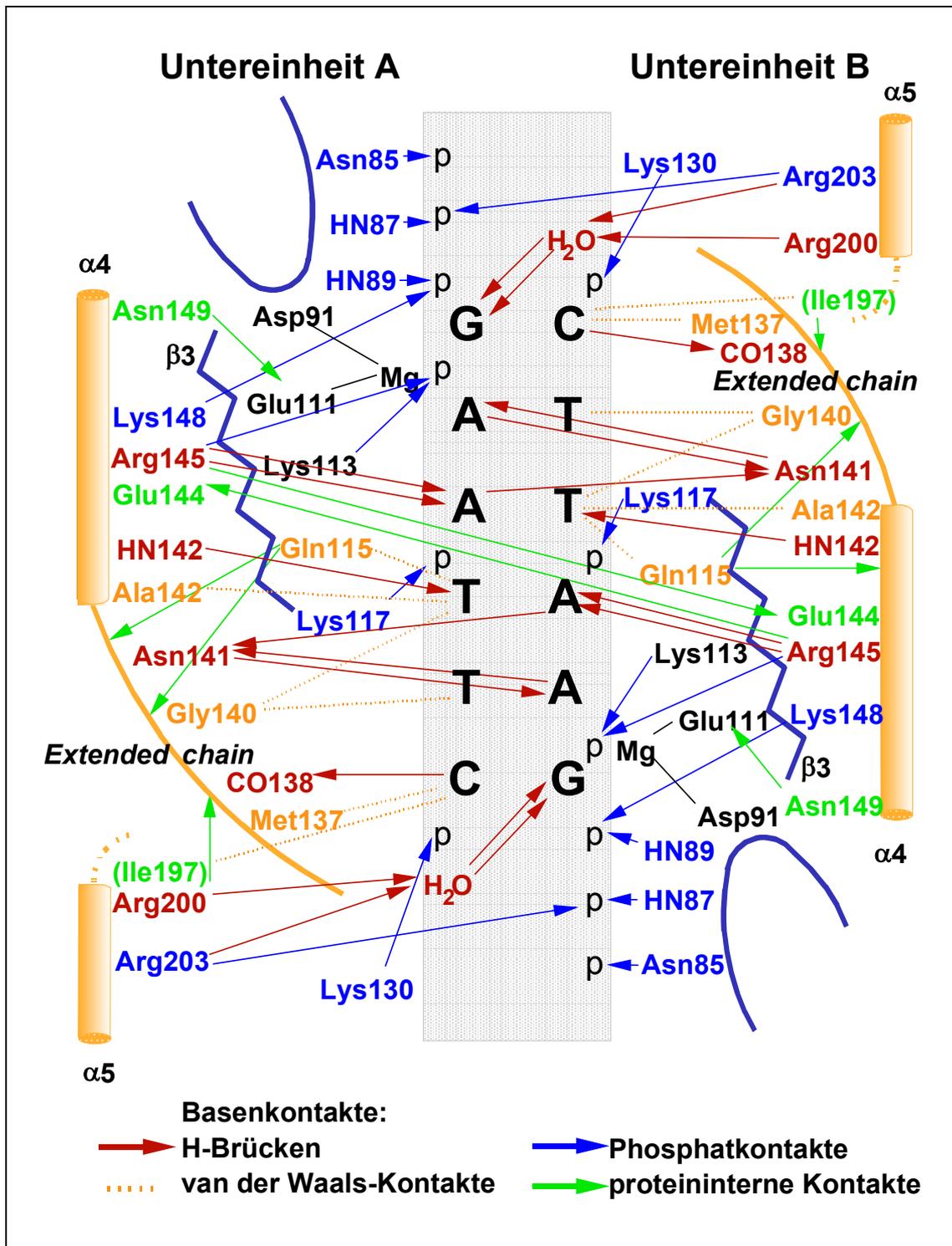


Abb. 1.4: Schematische Darstellung aller Kontakte der dimeren *EcoRI* zur Erkennungssequenz GAATTC

Die Mehrzahl der Basenkontakte wird von Aminosäuren des *Extended chain*-Motivs (Aminosäuren 137 bis 142) gebildet. Es konnte gezeigt werden, daß ein Peptid, welches aus diesen Aminosäuren besteht, in der Lage ist, schwach aber spezifisch die Erkennungssequenz zu binden [Jeltsch *et al.*, 1995; Vennekohl, 1999].

An der Erkennung des GC-Basenpaars, welches in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielt, sind die Aminosäuren Met137, Ala138, Arg200 und Arg203 beteiligt. Die ersten beiden Aminosäuren kontaktieren das Cytosin und die beiden zur Erkennungshelix $\alpha 5$ gehörenden Arginine das Guanin indirekt über ein zwischengelagertes Wassermolekül. Dabei bildet das Methionin mit seinem Schwefel einen hydrophoben Kontakt zum H5 und H6 und das Alanin vom CO der Peptidhauptkette eine Wasserstoffbrückenbindung zum N4 des Cytosins. Arg203 formt neben der Bindung zum Guanin auch einen Kontakt zum Phosphatrückgrat außerhalb der Erkennungssequenz [Rosenberg, 1991].

Zur Ausbildung der spezifischen Kontakte zur Erkennungssequenz ist eine strukturelle Adaption von Enzym und DNA (*Induced fit*) nötig. Nur durch diese konformationellen Änderungen sind Ausrichtung und optimale Abstände zur Bildung der Kontakte möglich. Dabei ist der spezifische Komplex gegenüber der Bindung unspezifischer DNA energetisch begünstigt. Die Strukturänderung der DNA konnte im Vergleich mit der Struktur des freien Oligodesoxynukleotids ermittelt werden [Drew *et al.*, 1981; Rinkel *et al.*, 1987]. Die zentralen Basenpaare weisen keine *Stacking*-Wechselwirkungen mehr auf und die zu spaltende Bindung befindet sich in einer optimalen Position für eine Spaltung durch die katalytischen Aminosäuren. Somit wird durch die Bindung an die Erkennungssequenz und die Ausbildung des spezifischen Protein-DNA-Komplexes eine direkte Verknüpfung von Erkennung und Spaltung der Sequenz hergestellt. Inwieweit das Enzym von einer Strukturänderung durch Bindung der Erkennungssequenz betroffen ist, kann nur vermutet werden, da bisher keine Strukturuntersuchungen des freien Enzyms im Detail vorliegen.

Neben den spezifischen Bindungen zur Erkennungssequenz gehen die gleichen Aminosäuren auch intramolekulare Kontakte im Protein ein. Eine zentrale Rolle dabei spielt Glu144, die für eine Vernetzung der beiden Proteinuntereinheiten sorgt. Sie stellt zum einen Verbindungen zu Asn141 und Arg203 derselben Untereinheit, zum anderen zu Arg145 und Lys148 der anderen Untereinheit her. Es handelt sich dabei um Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen ionischer Art. Auch die Aminosäure Gln115, die hydrophob mit dem inneren Thymin der Erkennungssequenz wechselwirkt, bildet intramolekulare Kontakte aus. Sie formt Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat des *Extended chain*. Lokalisiert ist sie direkt neben dem katalytischen Zentrum (Asp91, Glu111 und Lys113) im $\beta 3$ -Faltblatt,

welches sich bei Bindung der spezifischen Sequenz parallel zum Phosphatrückgrat der DNA ausrichtet. Ihr werden Aufgaben der Kommunikation zwischen einzelnen Proteinbereichen zugesprochen, die dafür sorgt, daß nach Bindung der spezifischen Sequenz die Spaltung der DNA eingeleitet wird. Diese Kommunikation wird auch als Kopplung von Erkennung und Katalyse bezeichnet [Jeltsch *et al.*, 1993-a]. Ein Austausch dieser hauptsächlich an der Vernetzung von Substrukturen des Enzyms beteiligten Aminosäuren führt zu Störungen in diesem Netzwerk und in der Kommunikation, so daß der Kopplungsprozeß zwischen spezifischer Bindung und Spaltung stark behindert ist und es zu gravierenden Einbußen in der Spaltaktivität kommen kann [Jeltsch *et al.*, 1993-a].

Die große Zahl an Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA im spezifischen Komplex und die überwiegend mehrfache Bindung jeder einzelnen Base der Erkennungssequenz läßt den Schluß zu, daß es sich bei der Erkennung um einen redundanten Vorgang handelt. Somit ist eine spezifische Substraterkennung trotz Verlust einer oder mehrerer Kontakte gewährleistet und führt nicht zu einer Veränderung der Sequenzspezifität, jedoch in den meisten Fällen zu einer Verminderung der Spaltaktivität, was durch Untersuchungen einer Vielzahl von Mutanten gezeigt werden konnte [Wolfes *et al.*, 1986; Yanofsky *et al.*, 1987; Geiger *et al.*, 1989-a; Alves *et al.*, 1989-a; Needles *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989; Osuna *et al.*, 1991; Heitman, 1992; Jeltsch *et al.*, 1993-a; Flores *et al.*, 1995; Fritz *et al.*, 1998]. Dies spricht für eine strikte Kopplung von Erkennung und Spaltung.

Diese strikte Kopplung wird ebenfalls bei der Analyse der Spaltung von *Star*sequenzen deutlich. Während die Bindungskonstante für die kanonische Sequenz gegenüber *Star*sequenzen nur um den Faktor 10^2 bis 10^3 größer ist, liegt die intrinsische Geschwindigkeitskonstante für die Spaltung dieser Sequenz um den Faktor 10^5 bis 10^6 höher, was zu einer effektiven Diskriminierung von *Star*sequenzen führt [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Hierbei ist auch das Assoziations- und Dissoziationsverhalten des Enzyms von Wichtigkeit. So erfolgt an der kanonischen Sequenz nach Spaltung eines Strangs (*Nicking*) wahlweise die Spaltung des anderen Strangs oder das Abdissoziieren des Enzyms [Langowski *et al.*, 1980; Alves *et al.*, 1989-b], während sich das Enzym nach Einzelstrangspaltung an *Star*sequenzen in jedem Fall von der DNA löst, so daß es der Zelle ermöglicht wird, den Einzelstrangbruch mit Hilfe einer Ligase zu reparieren. Für das Restriktionsenzym *EcoRV* konnte dies auch *in vivo* gezeigt werden [Taylor *et al.*, 1990].

Eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung und Spaltung werden zweiwertigen Kationen zugeordnet. Entgegen der früher verbreiteten Meinung, daß die spezifische DNA-Bindung von Restriktionsendonukleasen (zum Beispiel *EcoRI* und *BamHI*) unabhängig von der

Anwesenheit divalenter Kationen sei, werden immer mehr Enzyme bekannt, die von diesem Verhalten abweichen. So binden zum Beispiel die Enzyme *EcoRV* [Vipond & Halford, 1995], *Cfr9I* [Siksnys & Pleckaityte, 1993] und *MunI* [Lagunavicius & Siksnys, 1997] nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen spezifisch an ihre Erkennungssequenz, bei Abwesenheit dieser erfolgt die Bindung unspezifisch. Zur Untersuchung dieses Verhaltens bietet sich die Verwendung von Ca^{2+} -Ionen an, da diese eine spezifische Bindung ermöglichen, ohne das katalytische Zentrum zur Spaltung zu aktivieren [Vipond & Halford, 1995]. Auch *EcoRI* kann in Abhängigkeit divalenter Kationen verschiedene Konformationen einnehmen [Alves *et al.*, 1989-b]. Außerdem sind Mutanten von ihr bekannt, die zur spezifischen Bindung [Windolph & Alves, 1997-a] oder zur Stabilisierung der Faltung [Gerschon, 2000] zweiwertige Ionen benötigen. Für die Katalyse sind divalente Kationen essentiell. Neben Magnesium-Ionen führen auch Mangan- oder mit geringerer Effektivität Kobalt- und Nickel-Ionen zu einer Spaltung der DNA [Woodhead *et al.*, 1981; Vipond & Halford, 1995]. Im *EcoRI*-DNA-Komplex wird das essentielle Mg^{2+} -Ion von den Aminosäuren Asp91 und Glu111 koordiniert. Die dritte für die Katalyse zuständige Aminosäure Lys113 baut währenddessen eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem zu spaltenden Phosphat auf [Rosenberg, 1991].

1.2.3 Katalyse

Die Spaltung der DNA durch *EcoRI* erfolgt durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats. Es ist eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion, der nukleophile Angriff wird von einem aktivierten Wassermolekül durchgeführt [Connolly *et al.*, 1984]. Mehrere Bedingungen müssen für die Spaltung erfüllt sein: die Erhöhung der Elektrophilie des Phosphoratoms durch eine Lewisäure, die Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls durch eine Base, die Stabilisierung der negativen Ladung im Übergangszustand und die Protonierung der Fluchtgruppe. Als möglicher Mechanismus für die Reaktion wurde das Modell der substratunterstützten Katalyse vorgeschlagen [Jeltsch *et al.*, 1992]. In Abbildung 1.5 ist der Katalysemechanismus dargestellt.

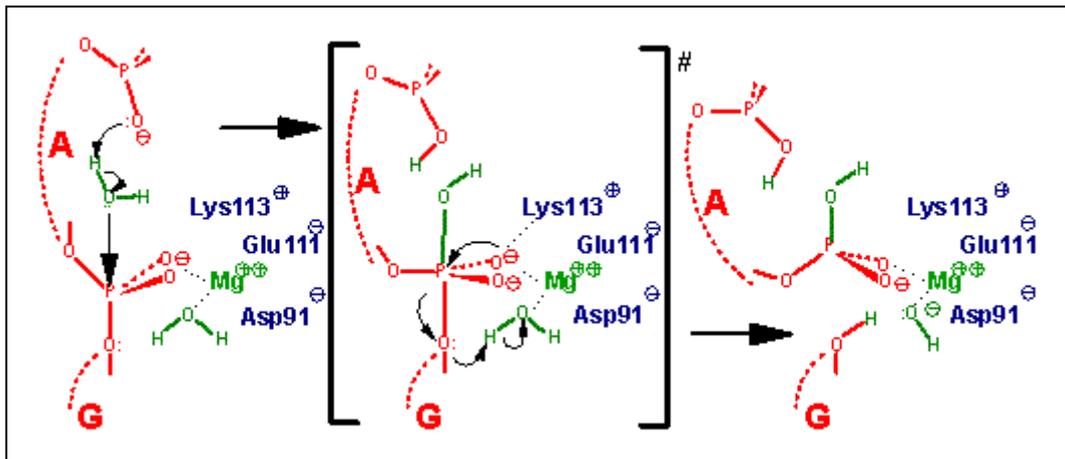


Abb. 1.5: Postuliertes Modell der substratunterstützten Katalyse zur Spaltung der Phosphodiesterbindung durch *EcoRI*

Die Aktivierung bzw. Erhöhung der Nukleophilie des angreifenden Wassermoleküls erfolgt durch Abstraktion eines Protons durch den pro- R_P -Phosphorylsauerstoff der Phosphatgruppe, die in 3'-Richtung der zu spaltenden Phosphatgruppe direkt benachbart ist [Jeltsch *et al.*, 1993-b]. Die Elektrophilie des anzugreifenden Phosphoratoms wird durch eine Polarisierung der nicht zum DNA-Rückgrat gehörenden P-O-Bindung durch das Magnesium-Ion gesteigert. Dieses Magnesium-Ion wird von den Aminosäuren Asp91 und Glu111 gegenüber der zu spaltenden Bindung positioniert [Jeltsch *et al.*, 1992]. Der Angriff des aktivierten Wassermoleküls erfolgt aus 3'-Richtung. Dabei wechselt der Phosphatester von tetraedrischer Anordnung in den trigonal bipyramidalen Übergangszustand, was dadurch erleichtert wird, daß ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe in die Koordinationssphäre des Magnesium-Ions aufgenommen werden kann [Heitman, 1992]. Die zusätzlich auftretende negative Ladung im Übergangszustand wird durch die basische Aminosäure Lys113 neutralisiert. Abschließend wird die Fluchtgruppe durch ein Wassermolekül aus der Koordinationssphäre des Magnesium-Ions protoniert und gleichzeitig die Esterbindung gelöst, so daß die Spaltung des DNA-Rückgrats vollzogen ist. Die Hydrolyse erzeugt aufgrund des Angriffs aus 3'-Richtung ein 5'-Phosphat und erfolgt unter Inversion der Konfiguration der Phosphatgruppe [Connolly *et al.*, 1984].

1.3 Strukturvergleich von *EcoRI* mit anderen Restriktionsendonukleasen

Bis heute sind mehr als 50 TypII-Restriktionsendonukleasen sequenziert und biochemisch charakterisiert. Ihre Gene weisen mit Ausnahme einiger Iso- und Neoschizomere keine Sequenzhomologien auf. Klassische DNA-Bindungsmotive wie Helix-Turn-Helix- oder basische Helix-Loop-Helix-Strukturen, Zink-Finger oder basische Zipper kommen nicht vor

[Pingoud & Jeltsch, 1997]. Es konnten jedoch signifikante strukturelle Übereinstimmungen in bestimmten funktionell ähnlichen Teilbereichen gefunden werden [Siksnys *et al.*, 1995].

Kristallstrukturen sind bisher von dreizehn Restriktionsendonukleasen bekannt. Diese sind in Tabelle 1.1 mit einigen Eigenschaften aufgelistet.

Tab. 1.1: TypII-Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur; für *NaeI* Angabe der Anzahl der Aminosäuren nur für die den Restriktionenzymen verwandte Endo-Domäne

Restriktions- endonuklease	Autoren	Anzahl Aminosäuren	Erkennungssequenz
<i>EcoRI</i>	Kim <i>et al.</i> , 1990	276	G↓AATTC
<i>EcoRV</i>	Winkler <i>et al.</i> , 1993	245	GAT↓ATC
<i>BamHI</i>	Newman <i>et al.</i> , 1994/1995	213	G↓GATCC
<i>PvuII</i>	Athanasiadis <i>et al.</i> , 1994	157	CAG↓CTG
<i>Cfr10I</i>	Bozic <i>et al.</i> , 1996	285	Pu↓CCGGPy
<i>FokI</i>	Wah <i>et al.</i> , 1997	583	GGATGN ₉ /N ₁₄
<i>BglI</i>	Newman <i>et al.</i> , 1998	299	GCCNNNN↓NGGC
<i>MunI</i>	Deibert <i>et al.</i> , 1999	203	C↓AATTG
<i>NaeI</i>	Huai <i>et al.</i> , 2000	162	GCC↓GGC
<i>NgoMIV</i>	Deibert <i>et al.</i> , 2000	288	G↓CCGGC
<i>BglII</i>	Lukacs <i>et al.</i> , 2000	223	A↓GACTC
<i>BsoBI</i>	van der Woerd <i>et al.</i> , 2001	323	C↓PyCGPuG
<i>Bse634I</i>	Grazulis <i>et al.</i> , 2002	293	Pu↓CCGGPy

Die Enzyme *EcoRV*, *PvuII* und *NaeI* erzeugen bei der Spaltung glatte DNA-Enden, während die übrigen aufgelisteten Restriktionsendonukleasen überhängende Enden bilden. *FokI* schneidet die DNA eine Helixwindung von der Erkennungssequenz entfernt. Bei *Cfr10I* und *Bse634I* handelt es sich um Isoschizomere, die die gleiche Sequenz erkennen und spalten. Trotz mangelnder Sequenzhomologien weisen die Enzyme deutliche Strukturhomologien auf. In Abbildung 1.6 sind die Strukturen der Restriktionsendonukleasen mit Ausnahme von *FokI* ohne DNA (*Cfr10I*, *Bse634I* und *NaeI*) oder im Komplex mit DNA dargestellt.

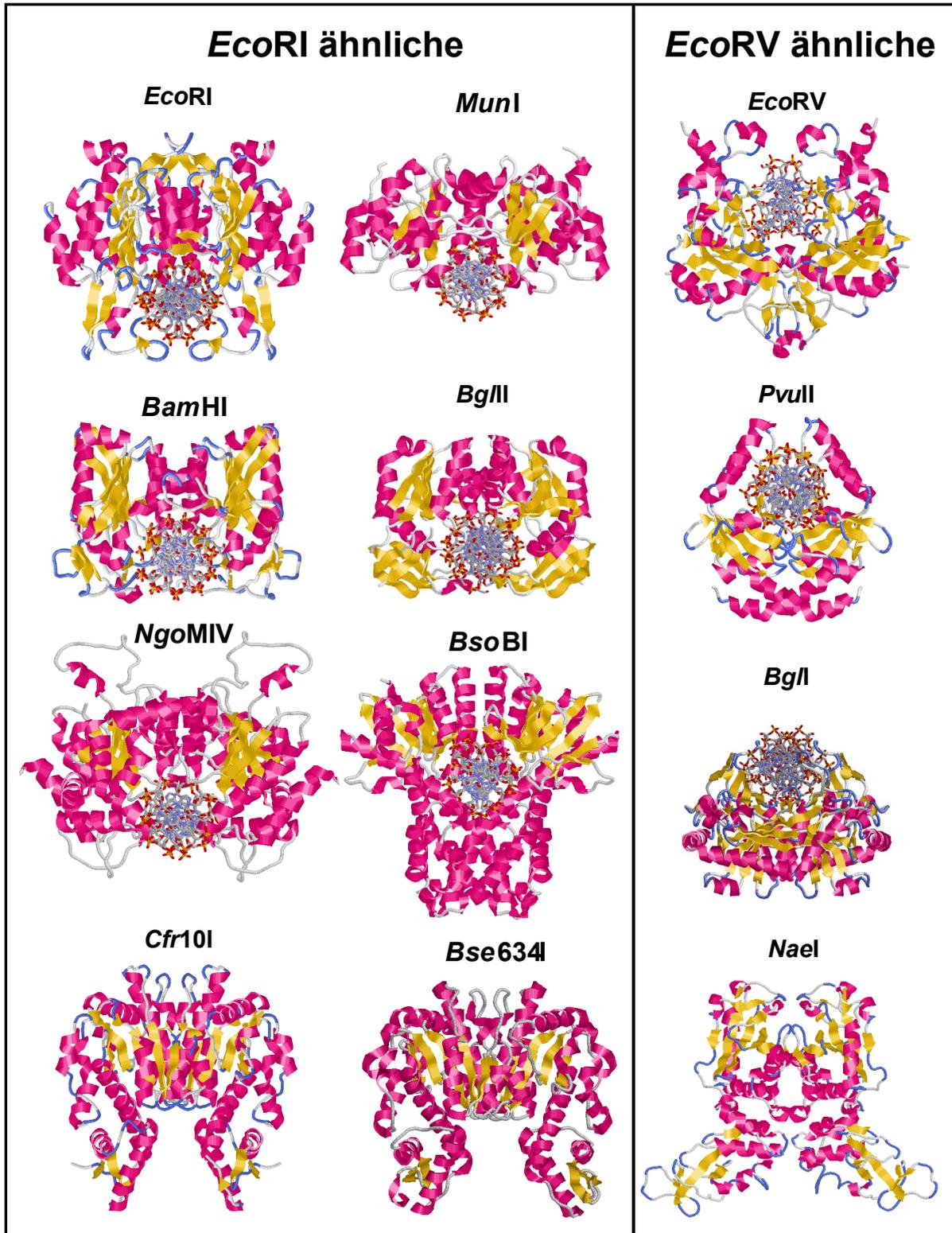


Abb. 1.6: Vergleich der Strukturen von Restriktionsendonukleasen im Komplex mit und ohne DNA (*Cfr10I*, *Bse634I*, *NaeI*); die Anordnung der Komplexe ist so gewählt, daß die große Furche am Mittelpunkt der Erkennungssequenz nach oben weist

Alle dreizehn Restriktionsendonukleasen weisen ein gemeinsames Strukturmotiv auf, das aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt besteht und die Aminosäuren des aktiven Zentrums enthält (vergleiche auch Abbildungen 1.7 und 1.8).

Hinsichtlich des Spaltverhaltens lassen sich die Enzyme in zwei Gruppen unterteilen. Die Enzyme der einen Gruppe nähern sich der DNA von der großen Furche her und erzeugen bei der Spaltung einen 5'-Überhang (siehe *EcoRI* ähnliche Enzyme in Abbildung 1.6). Bei der anderen Gruppe erfolgt die Annäherung über die kleine Furche und es werden glatte Enden oder 3'-Überhänge gebildet (siehe *EcoRV* ähnliche Enzyme in Abbildung 1.6). Der Unterschied liegt in der relativen Position der zu spaltenden Phosphodiesterbindung innerhalb der Erkennungssequenz. Während die Spaltung von DNA zu glatten Enden (*EcoRV*, *PvuII*, *NaeI*) aus der kleinen Furche geschehen kann, ist bei der Erzeugung eines 5'-Überhangs die kognate Sequenz nur von der großen Furche her zugänglich [Anderson *et al.*, 1993]. Durch Vergleich der Topologien der Enzyme werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Gruppen deutlicher. In Abbildung 1.7 sind zunächst die Sekundärstrukturelemente einiger Enzyme, die sich der DNA von der großen Furche her nähern, dargestellt. In Abbildung 1.8 folgt die Gegenüberstellung der Enzyme mit Annäherung über die kleine Furche.

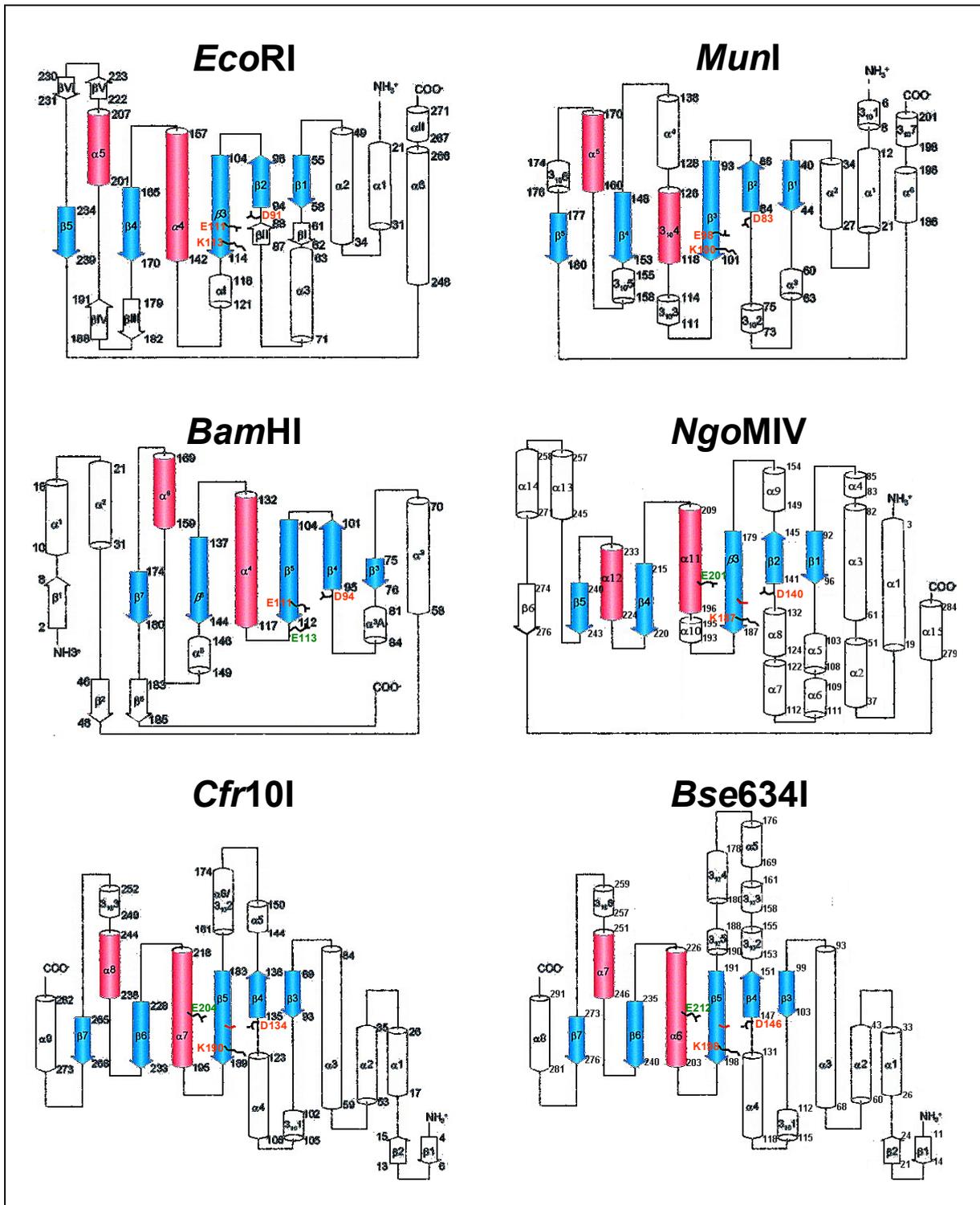


Abb. 1.7: Vergleich der Topologien der Sekundärstrukturelemente der Enzyme, die sich der DNA von der großen Furche her nähern; gemeinsame Strukturmodule sind farbig gekennzeichnet: das fünfsträngige β-Faltblatt blau, das aus zwei α-Helices aufgebaute Dimerisierungsmotiv rot; die katalytisch wirksamen Aminosäuren sind beschriftet, wobei Ausnahmen vom allgemein gültigen Sequenzmotiv PDX₉₋₁₈(E/D)ZK grün markiert sind; die in den Enzymen *NgoMIV*, *Cfr10I* und *Bse634I* anstelle einer der sauren Aminosäuren vorkommenden, vom Sequenzmotiv abweichenden Aminosäuren sind durch rote Strukturen hervorgehoben (vergleiche auch Abbildung 1.9)

Das fünfsträngige β -Faltblatt, das zentrale Strukturmotiv, ist in allen sechs Strukturen zu erkennen (blau markiert). Darüber hinaus weisen die Enzyme ein gemeinsames Dimerisierungsmotiv auf (rot markiert), welches aus zwei α -Helices besteht. Die Ausrichtung des Enzyms zur DNA wird wahrscheinlich durch diese Interaktionsfläche bestimmt. *Bam*HI, *Eco*RI und *Mun*I enthalten eine *Loop* in der Dimerisierungsfläche, die die gleiche Ausrichtung zum Faltblatt aufweist.

Aufgrund dieser großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen *Eco*RI und *Bam*HI wurde ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung postuliert [Newman *et al.*, 1994], der auf *Mun*I ausgedehnt werden kann. Auch bei einem Vergleich der Erkennungssequenzen läßt sich eine große Ähnlichkeit feststellen (siehe Tabelle 1.1). Die kognaten Sequenzen von *Eco*RI und *Mun*I unterscheiden sich lediglich im äußeren Basenpaar, die von *Eco*RI und *Bam*HI im davon benachbarten Basenpaar. Bei einer paarweisen Gegenüberstellung können weitere Gemeinsamkeiten zwischen *Eco*RI und *Mun*I entdeckt werden. Die DNA wird bei der spezifischen Bindung in gleicher Weise geknickt und die Spaltung erfolgt an gleicher Position neben dem zentralen AATT-Motiv. Die Erkennung dieser zentralen Basenpaare wird nahezu identisch durchgeführt. Die in beiden Enzymen vorkommende Aminosäuresequenz GNAXER (siehe Abbildung 1.4) ist entlang der großen Furche angeordnet und verantwortlich für die spezifischen Kontakte zu den inneren Basenpaaren. Die Erkennung des äußeren Basenpaars ist allerdings unterschiedlich. Während sie von *Mun*I durch eine einzelne Aminosäure (Arg115) erreicht wird, kontaktiert *Eco*RI die DNA an dieser Stelle mit vier Aminosäuren (Met137, Ala138, Arg200, Arg203), die auf zwei unterschiedlichen Segmenten des Proteins lokalisiert sind (siehe 1.2.2). Ein weiterer Unterschied besteht in den zwei armähnlichen Strukturen (*Inner arm*, *Outer arm*), die *Eco*RI für die Erkennung verwendet. Der *Outer arm* ist bei *Mun*I nicht vorhanden, der *Inner arm* ist verkürzt und besitzt eine andere Konformation [Lukacs & Aggarwal, 2001].

Zwischen *Eco*RI und *Bam*HI existieren trotz der oben beschriebenen Ähnlichkeiten wesentliche Unterschiede. Die von *Eco*RI während der spezifischen Bindung erzeugte Verzerrung der DNA im zentralen AATT-Motiv tritt bei *Bam*HI nicht in Erscheinung. Ebenso besitzt *Bam*HI keine vergleichbaren Strukturen zu *Inner* und *Outer arm* oder zum *Extended chain*-Motiv. Dafür wird von diesem Enzym zusätzlich eine C-terminal angeordnete α -Helix nur einer Untereinheit in die kleine Furche der DNA eingelagert. Auf diese Weise kontaktiert *Bam*HI die Basen eines Stranges und das Phosphatrückgrat des jeweils anderen Stranges, die Erkennung erfolgt also über Kreuz [Newman *et al.*, 1995].

Die Enzyme *Cfr10I*, *NgoMIV* und *Bse634I* liegen im Gegensatz zu *EcoRI* als Homotetramere vor. Sie können mit zwei Kopien der Erkennungssequenz interagieren und als Dimere von Dimeren mit einer Rücken-an-Rücken-Orientierung betrachtet werden [Pingoud & Jeltsch, 2001].

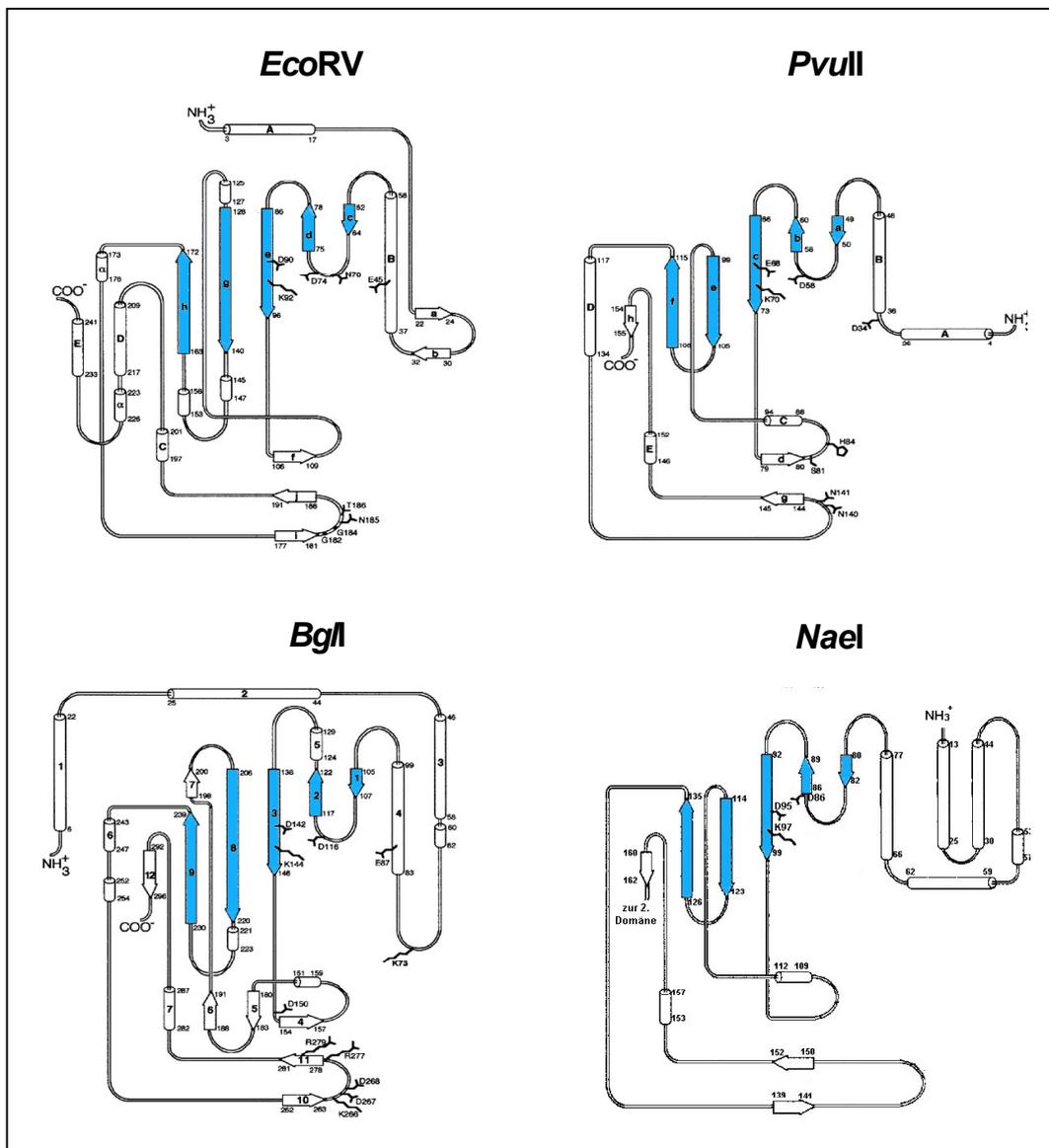


Abb. 1.8: Vergleich der Topologien der Sekundärstrukturelemente der Enzyme, die sich der DNA von der kleinen Furche her nähern; das fünfsträngige β -Faltblatt als gemeinsames Strukturmotiv ist blau markiert; die katalytisch wirksamen Aminosäuren sind beschriftet (vergleiche auch Abbildung 1.9)

Auch die Strukturen der Enzyme, die sich der DNA von der kleinen Furche her nähern, weisen das Motiv des fünfsträngigen β -Faltblatts auf (siehe Abbildung 1.8; blau markiert). Darüber hinaus besteht zwischen *EcoRI* und *EcoRV* eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der Verzerrung der DNA in der Mitte der Erkennungssequenz. Auch *EcoRV* entwindet bei Bindung die DNA, wobei ein Knick von 50° resultiert. Dies hat eine Erweiterung der kleinen

Furche, sowie die Verengung der großen Furche zur Folge, so daß dem Enzym ein besserer Zugang zu den zu spaltenden Phosphodiesterbindungen ermöglicht wird. Die DNA-Erkennung erfolgt im Gegensatz zu *EcoRI* über verschiedene Schleifenstrukturen, den *R-Loop* und den *Q-Loop*. Der als Erkennungsschleife bezeichnete *R-Loop* trägt mit zwölf von achtzehn direkten Wasserstoffbrückenbindungen, zwei van der Waals-Kontakten, sowie zwölf indirekten (wasservermittelten) Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat den größten Anteil an der Erkennung. Der glutaminreiche *Q-Loop* bildet vier Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen in der kleinen Furche. Auf ihm befindet sich die katalytisch wichtige Aminosäure Asp74 [Winkler *et al.*, 1993; Kostrewa & Winkler, 1995].

Die Restriktionsendonuklease *PvuII* besitzt zum Teil große Ähnlichkeit zu *EcoRV*. Allerdings tritt hier in der spezifischen Bindung keine Verzerrung der DNA auf. Als Erkennungsmotiv dient ein zweisträngiges, antiparalleles Falblatt, über das zwölf direkte Wasserstoffbrückenbindungen und einige van der Waals-Kontakte zu Basen der Erkennungssequenz und dem Phosphatrückgrat ausgebildet werden [Cheng *et al.*, 1994].

NaeI besitzt eine aus zwei Domänen bestehende Struktur. Eine der Domänen ist verantwortlich für Substratbindung, Spaltung und Dimerisierung und ist den anderen Restriktionsendonukleasen strukturell ähnlich. Die zweite Domäne enthält ein Helix-Turn-Helix-Motiv, welches auch in Topoisomerasen zu finden ist [Huai *et al.*, 2000].

BglI ähnelt hinsichtlich der Struktur der Untereinheit den beiden zur selben Gruppe gehörenden Enzymen *EcoRV* und *PvuII*. Der Zusammenschluß zweier Untereinheiten zu einem Dimer unterscheidet sich allerdings gänzlich von diesen. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß eine Dimerisierung von konservierten Untereinheiten auf mehreren Wegen stattfinden und dabei je nach Art der Dimerisierung unterschiedliches Spaltverhalten resultieren kann [Newman *et al.*, 1998].

Trotz der unterschiedlichen Strategien der DNA-Bindung und -Erkennung zeigt der Vergleich der aktiven Zentren der Restriktionsendonukleasen in der Superposition der katalytischen Aminosäuren eine hohe Homologie (siehe Abbildung 1.9). Dies impliziert eine Ähnlichkeit im Katalysemechanismus.

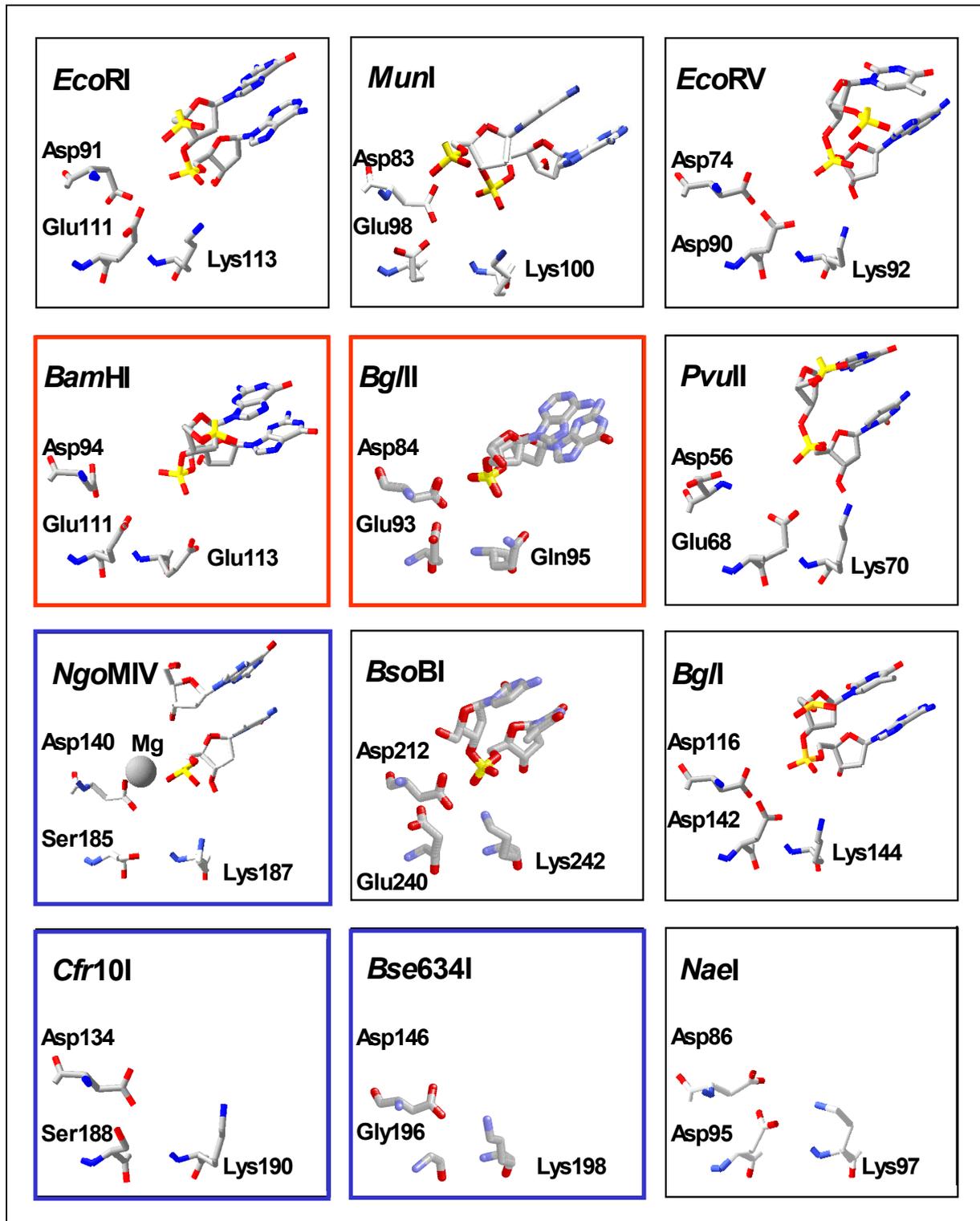


Abb. 1.9: Strukturelle Homologien der katalytischen Zentren der Restriktionsendonukleasen bekannter Kristallstruktur; Enzyme mit Abweichungen vom allgemein gültigen Sequenzmotiv PDX₉₋₁₈(E/D)ZK sind durch farbige Rahmen gekennzeichnet: rot markiert sind die Restriktionsendonukleasen, bei denen die basische Aminosäure ersetzt ist, bei den blau umrandeten ist eine der sauren Aminosäuren ausgetauscht

Das katalytische Zentrum ist auf einem zentral liegenden β -Faltblatt lokalisiert. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um zwei saure und eine basische Aminosäure. Aufgrund

dieser Übereinstimmungen wurde für das katalytische Zentrum von Restriktionsendonukleasen ein allgemein gültiges Sequenzmotiv der Zusammensetzung PDX₉₋₁₈(E/D)ZK ermittelt [Selent *et al.*, 1992]. Dabei ist X eine beliebige Aminosäure, während Z eine hydrophobe Aminosäure darstellt. Das Auftreten dieses Motivs kann als Hinweis auf ein katalytisches Zentrum dienen, ist jedoch nicht unbedingt verbindlich, da zum Beispiel *EcoRI* zwei Strukturmodule dieser Art pro Untereinheit aufweist, aber nur ein aktives Zentrum besitzt [Pingoud & Jeltsch, 1997].

Ausnahmen von diesem konservierten Sequenzmotiv bilden die Enzyme *BamHI*, *BglII*, *Cfr10I*, *Bse634I* und *NgoMIV*. *BamHI* verfügt über drei saure Aminosäuren (Asp, Glu, Glu). Außerdem werden zwei divalente Kationen koordiniert. In *BglII* ist die basische Aminosäure Lysin durch Glutamin ersetzt [Pingoud & Jeltsch, 2001]. Bei den anderen drei Restriktionsendonukleasen befindet sich entweder ein Serin (*Cfr10I*, *NgoMIV*) oder ein Glycin (*Bse634I*) anstelle einer der sauren Aminosäuren (Asp, Ser/Gly, Lys). Dafür wird an ähnlicher Position von einem anderen Strukturteil ein Glutamat ins aktive Zentrum rekrutiert [Bozic *et al.*, 1996; Deibert *et al.*, 2000; Grazulis *et al.*, 2002]. Ein Austausch des Serins gegen Glutamat in *Cfr10I* bewirkt ohne großen Verlust an Spaltaktivität eine Restaurierung des aktiven Zentrums [Skirgaila *et al.*, 1998]. Des Weiteren wird für diese drei Enzyme ein Vorhandensein von zwei Kationen im katalytischen Zentrum vermutet.

Auch in anderen DNA-modifizierenden Enzymen ist eine vergleichbare Organisation des aktiven Zentrums gefunden worden, zum Beispiel in der λ -Exonuklease [Kovall & Matthews, 1998], dem Reparaturenzym MutH aus *E. coli* [Ban & Yang, 1998] oder der TnsA-Untereinheit der Tn7-Transposase [Hickman *et al.*, 2000].

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI* in bezug auf das äußere Basenpaar (GC) der Erkennungssequenz. Dazu werden gezielte Einzel- und Mehrfachaus-tausche der Aminosäuren, die dieses Basenpaar kontaktieren, vorgenommen. Basierend auf den Ergebnissen von Küster (1998) dient dabei die Mutante M137Q als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen. Diese Mutante ist potentiell in der Lage, einen Kontakt zu einem Thymin anstelle des Cytosins der Erkennungssequenz zu bilden, außerdem zeigt sie eine Bevorzugung von 5-Methylcytosin. Im Wildtypenzym geht von dieser Aminosäureposition 137 ein

hydrophober Kontakt zur Erkennungssequenz aus. In Abbildung 1.10 sind alle Kontakte der *EcoRI* zum äußeren GC-Basenpaar dargestellt.

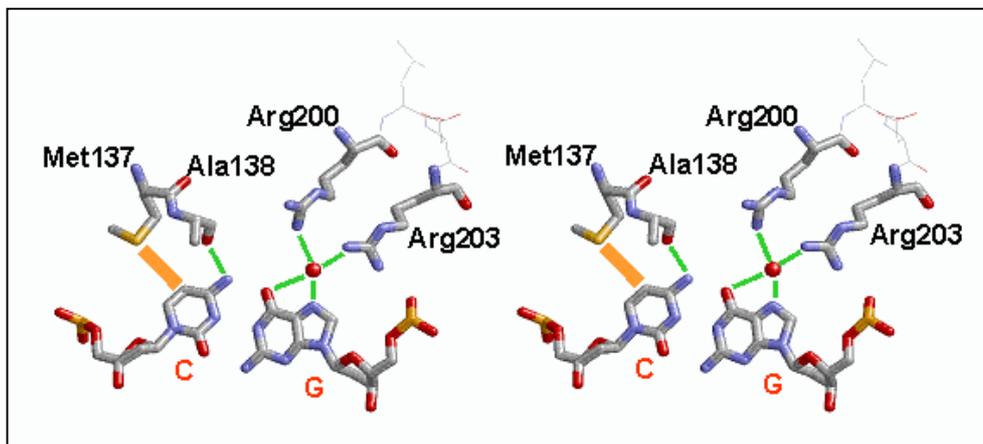


Abb. 1.10: Stereobild der Erkennung des GC-Basenpaars durch *EcoRI*; das Wassermolekül ist als rote Kugel dargestellt, Wasserstoffbrückenbindungen sind mit grünen, hydrophobe Kontakte mit orangefarbenen Verbindungslinien gekennzeichnet

Um neben den Resultaten von Küster (1998) weitere Erkenntnisse über die hydrophoben Wechselwirkungen an der Position 137 zu gewinnen, sollen zusätzliche Einzelmutanten mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese erzeugt und charakterisiert werden. Darüber hinaus wird so gewährleistet, daß keine unerwarteten Effekte versäumt oder interessante Mutanten übersehen werden, und nicht nur die Mutante M137Q eine Sonderstellung einnimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analysenreiner Form eingesetzt und von den Firmen AGS, Aldrich, Amersham Biosciences, Fluka, Gibco BRL, ICN, J. T. Baker, Merck, MWG Biotech AG, Qiagen, Riedel-de Haën, Roth, Serva, Sigma oder Whatman bezogen.

Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme von den Herstellern Amersham Biosciences, MBI Fermentas, New England Biolabs (NEB) oder Qiagen wurden entsprechend den angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

Für Transformation, Vermehrung von Plasmid-DNA und Expression von Proteinen werden ausschließlich Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*), die alle Abkömmlinge des Stammes K12 sind, verwendet. *E. coli* stammt aus der Familie der Enterobacteriaceae, die fakultativ anaerob und gramnegativ sind. Entsprechend ihrer Eigenschaften werden für die verschiedenen Arbeitsschritte folgende Stämme eingesetzt:

LK111(λ)

Genotyp: ($r_K^- m_K^+$), *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI^qZ Δ M15*, *Hfr*, λ^+

Dieser λ -lysogene Stamm exprimiert konstitutiv den λ -Repressor *cI*, wodurch Gene, die durch den P_L -Promotor kontrolliert werden, effektiv reprimiert sind. Er wird hauptsächlich zur Vermehrung von Plasmid-DNA eingesetzt.

TGE900

Genotyp: ($r_K^- m_K^-$), F^- , *su-1*, *ilv-1*, *bio*[$\lambda cI857\Delta BamHI$]

Dieser Stamm dient der Expression rekombinanter Proteine, hier im speziellen der Expression von Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI*. Da er den thermosensitiven λ -Repressor *cI857* exprimiert, der bei Temperaturen oberhalb 37 °C durch Monomerbildung inaktiviert wird, induziert eine Erhöhung der Inkubationstemperatur die Expression plasmidkodierter

Gene, welche durch den P_L -Promotor kontrolliert werden. Um die Bildung des toxischen Genproduktes *EcoRI* in der Bebrütungsphase zu verhindern, wird der Stamm bei 30 °C angezogen. Zum Schutz der zelleigenen DNA während der Proteinexpression des Restriktionsenzym werden plasmidhaltige Zellen eingesetzt. Auf diesem Plasmid ist die zu *EcoRI* korrespondierende Methylase codiert, die durch Methylierung das bakterielle Genom vor Restriktion schützt.

WK6mutS(λ)

Genotyp: ($r_K^- m_K^+$), $\Delta[lac proAB]$, *galE*, *strA*, *mutS215*: Tn10, F', *proAB*, *lacI^qZAM15*, λ^+

In diesem Stamm können *Mismatch*-Plasmide, die während der *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7.1) entstehen, repliziert werden. Da das verantwortliche Gen für die *Mismatch*-Reparatur (*mutS*) durch Tn10 zerstört wurde, ist der Stamm nicht in der Lage, fehlgepaarte Basenpaare zu korrigieren. Darüber hinaus ist der Stamm λ -lysogen und exprimiert konstitutiv den λ -Repressor, so daß Gene, die vom P_L -Promotor kontrolliert werden, reprimiert sind.

2.2.2 Nährmedien

Zur Kultivierung aller in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme wird Vollmedium nach Luria und Bertani (LB-Medium) eingesetzt.

LB-Medium:	10 g	Hefeextrakt (Gibco BRL)
	10 g	Pepton Nr. 140 (Casein-Hydrolysat, Gibco BRL)
	5 g	NaCl
	ad 1 L ddH ₂ O; pH 7,5 (NaOH)	

Für die Herstellung von Festmedien erfolgt ein Zusatz von 15 g Bacto-Agar (Gibco BRL) pro Liter Medium.

Alle Lösungen werden vor der Verwendung autoklaviert (121 °C, 30 min).

Die zur Selektion bestimmter Bakterienzellen benutzten Antibiotika werden in den in Tabelle 2.1 angegebenen Konzentrationen bei Flüssigmedien unmittelbar vor Benutzung und bei Festmedien nach Abkühlen der Lösungen auf etwa 50 °C vor dem Erstarren zugegeben.

Tab. 2.1: Konzentration von Antibiotika in Medien

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g mL}^{-1}$] in	
	Flüssigmedium	Festmedium
Ampicillin (Amp)	75	100
Chloramphenicol (Chl)	20	30
Tetracyclin (Tet)	10	10

2.2.3 Plasmidvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle. Sie können sich unabhängig vom bakteriellen Genom in der Zelle vermehren. Dabei hängt ihre Kopienzahl pro Zelle von dem enthaltenen Replikationsursprung (*Origin of replicaton, Ori*) ab. Bei bis zu 20 Kopien spricht man von einem *Low copy* Plasmid, bei einer Kopienzahl von mehreren hundert von einem *High copy* Plasmid. Neben einem Replikationsursprung enthalten Plasmide einen Selektionsmarker (meistens ein Antibiotikumsresistenzgen) und eine Klonierungsstelle (*Cloning site*) zum Einbringen fremder DNA. Für die Molekularbiologie geeignete Plasmidvektoren sind üblicherweise 2500 bis 5000 bp lang.

pBR2Eco (4379 bp)

Dieses Plasmid geht aus dem unten genannten Plasmid pBR322 hervor. Es wurden 16 bp eingefügt, die eine *EcoRI*-Schnittstelle enthalten, so daß ein Plasmid mit zwei Spaltstellen für *EcoRI* resultiert. Die Insertion befindet sich innerhalb des Tetracyclinresistenzgens, womit diese Antibiotikumsresistenz deletiert ist.

Wie das unten genannte Plasmid pBR322 wird dieses Plasmid als *Template* für die PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes verwendet, das für DNA-Bindungsstudien mit *EcoRI*-Mutanten (siehe 2.5.8) eingesetzt wird. Zusätzlich dient es als Substrat in Spaltexperimenten (siehe 2.5.9).

pBR322 (4363 bp)

Dieses *Low copy* Plasmid kann allgemein als Klonierungsvektor eingesetzt werden. Es enthält den Replikationsursprung ColE1 und verfügt als Selektionsmarker über eine Tetracyclin- und Ampicillinresistenz.

In dieser Arbeit dient das Plasmid zum einen als *Template* für die PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes für die Bestimmung von DNA-Bindungskonstanten der *EcoRI*-Mutanten (siehe 2.5.8). Außerdem wird es als Substrat zur Bestimmung der Spaltaktivität von *EcoRI*-Proteinen eingesetzt (siehe 2.5.6).

Darüber hinaus dient es als Ausgangsvektor für die Herstellung des Plasmids pBR2Eco (siehe 2.5.9.1).

pEcoR4 (5929 bp)

Auf diesem Plasmid befindet sich das *ecoRI*-Methylasegen, das konstitutiv exprimiert wird. Es ist bei Expression von *EcoRI* und deren Mutanten in dem Bakterienstamm TGE900 enthalten (siehe 2.2.1) und vermindert die toxische Wirkung des Restriktionsenzym dadurch, daß die zelleigene DNA durch Methylierung geschützt wird. So wird außerdem eine Überproduktion des Genprodukts ermöglicht.

Neben einer Chloramphenicolresistenz verfügt pEcoR4 über den Replikationsursprung p15A und ist somit zu pRIF309+(CH₆), welches das *ecoRI*-Gen trägt, kompatibel.

pRIF309+(CH₆) (5068 bp)

Dieses Plasmid ist ein Abkömmling des Vektors pBR322. Neben dem bakteriellen Replikationsursprung ColE1 zur Replikation des doppelsträngigen Plasmids enthält es den Replikationsursprung des f1-Phagen, der nach Superinfektion mit dem Phagen eine Produktion von einzelsträngigem Plasmid ermöglicht. Zusätzlich beinhaltet der Vektor das β-Laktamasegen, das durch den Tn903-Tet^R-Promotor konstitutiv exprimiert wird und welches plasmidhaltigen Bakterienzellen eine Ampicillinresistenz verleiht.

Auf diesem Plasmid befindet sich das *ecoRI*-Gen, an dessen C-Terminus sechs Histidine fusioniert sind [Rotzal, 1992], die eine affinitätschromatographische Aufreinigung des Genprodukts (*EcoRI*_{His6}) ermöglichen (siehe 2.4.3.1). Kontrolliert wird dieses Gen durch den P_L-Promotor und den fd-Terminator. Da das Genprodukt eine hohe Toxizität aufweist, kann das Plasmid nur in Stämmen gehalten werden, die den λ-Repressor konstitutiv exprimieren. Verwendung findet dieses Plasmid als Klonierungsvektor für *EcoRI*-Mutanten (siehe 2.3.7) und als Substrat in Spaltexperimenten (siehe 2.5.6).

pUC8 (2665 bp)

pUC8 ist ein *High copy* Plasmid, welches gewöhnlich als Klonierungsvektor verwendet wird. In geeigneten Stämmen (*lacZ*ΔM15) kann mit diesem Klonierungsvektor eine Selektion

rekombinanter Plasmide durch *Blue/White-Screening* erfolgen (α -Komplementation), da sich die *Multiple cloning site*, in die DNA-Fragmente üblicherweise inseriert werden, innerhalb des *lacZ*(α)-Fragments befindet. Des Weiteren enthält pUC8 den Replikationsursprung ColE1 und verfügt als Selektionsmarker über eine Ampicillinresistenz.

In dieser Arbeit wird das Plasmid verwendet, um die Spaltaktivität von *EcoRI*-Mutanten genauer zu charakterisieren (siehe 2.5.6).

Außerdem dient es als Ausgangsvektor für das Plasmid pUCMunI (siehe 2.3.8).

pUCMunI (2380 bp)

Dieses Plasmid geht aus dem oben genannten Plasmid pUC8 hervor. Hierfür wurde das DNA-Fragment zwischen den zwei Schnittstellen für *PvuII* deletiert und eine DNA-Sequenz von 16 bp Länge, die eine *MunI*-Schnittstelle enthält, eingefügt. Mit der Deletion ist neben der *Multiple cloning site* auch ein großer Teil des *lacZ*(α)-Fragments verloren, so daß mit diesem Plasmid nur unter Einschränkung Klonierungen durchgeführt werden können.

Mit diesem Plasmid wird ebenfalls das Spaltverhalten einiger *EcoRI*-Mutanten untersucht (siehe 2.5.6).

2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Bakterien sind ohne Modifikation der Zellmembran nicht in der Lage, DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Die erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran kann mit verschiedenen chemischen und physikalischen Methoden erreicht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Zellen sind ausschließlich nach chemischen Methoden präpariert (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.2).

2.2.4.1 TSS-Methode (Transformation and Storage in the same Solution)

Bei der TSS-Methode nach Chung *et al.* (1989) wird die bakterielle Zellmembran durch DMSO und PEG, ein Detergenz, geschädigt. Um während der Transformation die negative Ladung der aufzunehmenden DNA abzuschirmen, sind Mg^{2+} -Ionen zugesetzt. Die so behandelten Zellen erreichen eine Kompetenz von 10^6 bis 10^8 Kolonien je μg eingesetzter DNA (cfu μg^{-1}) und sind bei -70 °C bis zu einem Jahr stabil.

Aus einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stamms wird in 100 mL LB-Medium überimpft. Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600nm} = 0,4-0,6$ (2 bis 3 h) werden die

Zellen sedimentiert ($1300 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und in 10 mL eiskalter TSS-Lösung (1/10 des Kulturvolumens) resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Aliquotierung zu $100\ \mu\text{L}$ und ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, wonach die Zellen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

TSS-Lösung: 10 % (w/v) PEG 6000
 5 % (v/v) DMSO
 50 mM MgCl_2
 in LB-Medium; pH 6,5-6,8 (NaOH)

2.2.4.2 Rubidiumchlorid-Methode

Die Präparation kompetenter Zellen kann auch nach der Rubidiumchlorid-Methode, einer modifizierten Methode nach Hanahan (1983) erfolgen. Bei diesem Verfahren können Kompetenzen in ähnlicher Größenordnung wie bei der TSS-Methode erzielt werden. Die Zellen sind ebenfalls bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens ein Jahr stabil.

Aus einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stamms wird in 100 mL LB-Medium überimpft und die Kultur bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4-0,6$ angezogen (2 bis 3 h). Die Zellen werden sedimentiert ($1300 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), in 100 mL eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gehalten. Alle weiteren Schritte müssen auf Eis mit gekühlten Gefäßen ausgeführt werden. Nach erneuter Sedimentation ($1300 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) werden die Zellen in 10 mL eiskalter TFB2-Lösung resuspendiert und 15 bis 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Aliquotierung zu $100\ \mu\text{L}$ und ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, wonach die Zellen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

TFB1-Lösung: 30 mM KAc
 100 mM RbCl
 10 mM CaCl_2
 50 mM MnCl_2
 15 % (w/v) Glycerin
 pH 5,8 (HAc)
 Die Lösung wird zu 100 mL aliquotiert und autoklaviert.

TFB2-Lösung: 10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂
 15 % (w/v) Glycerin
 pH 6,5 (KOH)
 Die Lösung wird zu 10 mL aliquotiert und autoklaviert.

2.2.5 Transformation von Bakterienzellen

Unabhängig von der Herstellungsmethode chemisch kompetenter Zellen (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.2) erfolgt die Transformation nach folgender Vorschrift:

Ein 100 µL-Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wird auf Eis aufgetaut und mit der zu überführenden DNA (etwa 100 ng) versetzt. Das Gemisch wird zunächst 45 min auf Eis inkubiert, dann 2 min einem Hitzeschock (siehe Tabelle 2.2) ausgesetzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Die Temperatur des Hitzeschocks ist von der Art der Zellen abhängig und liegt 5-7 °C über der optimalen Bebrütungstemperatur.

Nun wird der Transformationsansatz mit 900 µL LB-Medium versetzt und 1 h bei optimaler Wachstumstemperatur inkubiert. Die Zellen werden schonend sedimentiert (1000 × g, 3 min, 4 °C), nach Abgießen des Überstands im Restvolumen resuspendiert und auf festem Selektivmedium ausgestrichen. Die Anzucht der Bakterienkolonien erfolgt über Nacht bei optimaler Bebrütungstemperatur (siehe Tabelle 2.2).

Tab. 2.2: Hitzeschock- und Bebrütungstemperatur für die verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Temperatur [°C] für	
	Hitzeschock	Bebrütung
LK111(λ)	42	37
WK6mutS(λ)	42	37
TGE900	37	30

2.2.6 Lagerung von Bakterienzellen

Die Überlebensfähigkeit von Bakterienzellen sowohl in Flüssigmedium als auch auf Agar ist begrenzt. Flüssigkulturen können nur bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden, Kolonien

auf Agarplatten sind (mit Parafilm) versiegelt etwa drei bis vier Wochen zum Überimpfen geeignet, um so ein Absterben der Zellen zu verhindern.

Glycerinkulturen sind noch nach jahrelanger Lagerung bei -70 °C zum Animpfen von Flüssigkulturen oder agarhaltigen Nährböden geeignet.

Eine 5 mL-LB-Kultur wird bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600\text{nm}} = 0,2-0,3$ (frühe logarithmische Phase) angezogen. 800 μL dieser Bakteriensuspension werden zu 200 μL sterilem (autoklaviertem) 87 %igem Glycerin in einem Kryoröhrchen (Greiner, Nalgene[®]) gegeben. Nach kurzer Eiskühlung werden die Zellen bei -70 °C gelagert.

2.2.7 Expressionstest

Der Expressionstest wird zur Überprüfung der Expression des rekombinanten Genprodukts, in dieser Arbeit der Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI*, durchgeführt.

5 mL LB-Medium wird mit einer bei 30 °C gewachsenen Übernacht-Kultur des Expressionsstamms TGE900(pEcoR4), welcher das Plasmid mit dem betreffenden mutierten *ecoRI*-Gen enthält, angeimpft. Dem Nährmedium werden als Selektionmarker sowohl Ampicillin (pRIF309+(CH₆)) als auch Chloramphenicol (pEcoR4) zugefügt. Nach einer Wachstumszeit von drei bis vier Stunden ($OD_{600\text{nm}} = 0,5-0,7$) werden 500 μL des Kulturvolumens (Probe vor Induktion) entnommen und kalt gestellt. Nach Zugabe von 500 μL 20 %iger steriler Glucoselösung zur Wachstumssteigerung wird die Expression des plasmidcodierten, rekombinanten Genprodukts durch eine Temperaturerhöhung auf 42 °C induziert. Nach zwei Stunden werden erneut 500 μL entnommen (Probe nach Induktion).

Zur Überprüfung der Expression werden sämtliche Zellproben sedimentiert ($13000 \times g$, 5 min, 4 °C) und in 30 bzw. 50 μL Laemmli-Auftragspuffer (vor bzw. nach der Induktion) resuspendiert. Nach Erhitzen auf 95 °C für zwei Minuten werden sie auf Eis abgekühlt und anschließend auf einem 17,5 %igen Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) analysiert.

Laemmli-Auftragspuffer:	160 mM	Tris/HCl pH 6,8
(2fach)	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	Mercaptoethanol
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
	16 % (w/v)	Saccharose

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen werden Produkte der Firma Qiagen verwendet: das *QIAprep Spin Miniprep* System für Kulturvolumen von 5 mL und *QIAGEN-tip 100*-Säulen für 100 mL Kulturvolumen. Die Ausbeuten betragen etwa 10 µg bzw. 100 µg DNA.

Für die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (siehe 2.3.6.1) wird das *QIAquick Gel Extraction Kit* eingesetzt.

Die Durchführung erfolgt jeweils entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.3.2 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Während einer Klonierung ist es nötig, Plasmide mit Restriktionsenzymen zu spalten, zum Beispiel für die Erzeugung von Mutageneserahmen und *-inserts* oder zur Überprüfung der mutierten Plasmide. Die Trennung der erhaltenen Fragmente erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.3.6.1) entweder analytisch (geringe DNA-Menge: 0,5-1 µg) oder präparativ (5-10 µg DNA) mit anschließender Rückgewinnung der DNA aus der Gelmatrix (siehe 2.3.1) für die Klonierung. Durch Vergleich mit Standards bekannter Größe kann eine Längenabschätzung der DNA-Fragmente im Gel vorgenommen werden. Dabei ist die Laufstrecke linearer Fragmente ihrer Länge umgekehrt proportional.

Analytische Spaltung: 0,5-1 µg Plasmid-DNA werden mit 5-10 U einer Restriktionsendonuklease gemäß den Herstellerangaben für eine Stunde bei optimaler Temperatur im mitgelieferten Puffer inkubiert. Durch Zugabe von 5 µL Agaroseauftragspuffer wird die Reaktion gestoppt. Die Proben werden anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Alternativ kann die Analyse auch auf einem Polyacrylamidgel erfolgen (siehe 2.3.6.2), wobei dann allerdings der PAA-Auftragspuffer (siehe 2.5.7) benutzt wird.

Präparative Spaltung: 5-10 µg Plasmid-DNA werden mit 10-20 U einer Restriktionsendonuklease gemäß den Herstellerangaben für mehrere Stunden oder über Nacht bei optimaler Temperatur im mitgelieferten Puffer inkubiert. Sollen die entstandenen Fragmente quantitativ getrennt werden, wird der komplette Spaltansatz durch Zugabe von Agaroseauftragspuffer gestoppt, auf ein Agarosegel aufgetragen und das gewünschte DNA-Fragment nach der Trennung aus der Gelmatrix isoliert (siehe 2.3.1). Alternativ dazu kann zur Überprüfung der Spaltung ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert werden, während der übrige Spaltansatz mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt wird.

Bei Kombinationsspaltungen mit zwei oder mehreren Enzymen pro Ansatz werden die Pufferbedingungen so gewählt, daß alle Enzyme zu mindestens 50 % aktiv sind.

Agaroseauftragspuffer:	0,25 M	EDTA
(5fach)	1,2 % (w/v)	SDS
	25 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol FF

2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Neben der Restriktionsspaltung ist die Ligation von DNA-Fragmenten eine wichtige Technik in der Molekularbiologie. Hierbei werden DNA-Enden mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase verknüpft. Die Reaktion kann sowohl intra- als auch intermolekular ablaufen, so daß das Enzym in der Lage ist, alle in doppelsträngiger DNA vorkommenden Brüche zu reparieren. Die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe erfolgt unter Verbrauch von ATP, das dem Reaktionsansatz zugesetzt werden muß.

Je nach Art der zu verknüpfenden DNA-Enden unterscheiden sich die Ligationsbedingungen. Einzelsträngige Überhänge (*Sticky ends*) erleichtern die Ligation durch Basenpaarung untereinander. Diese Ligationen werden meist bei 37 °C oder Raumtemperatur (RT)

ausgeführt. Die Verknüpfung von glatten DNA-Enden (*Blunt ends*) sollte bei niedrigerer Temperatur (16 °C; Herabsetzung der kinetischen Energie der Fragmente) über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden.

Für die Ligationsreaktion werden etwa äquimolare Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Bei sehr großem Längenunterschied der Fragmente kann ein Überschuss des kleineren DNA-Stückes die Ligationsausbeute erhöhen.

Im Reaktionsansatz werden äquimolare Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen mit einem Zusatz von 5 nmol ATP zusammengegeben. Die Inkubation erfolgt für *Sticky end*-Ligationen mit 1-2 U T4-DNA-Ligase bei RT bzw. 37 °C für 1-3 h, für *Blunt end*-Ligationen mit 5 U Ligase bei 16 °C über Nacht.

Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C (10 min, anschließend auf Eis) können mit dem Reaktionsansatz kompetente Zellen transformiert werden (siehe 2.2.5).

2.3.4 Modifikation von DNA (Dephosphorylierung/Phosphorylierung)

Besitzt der Rahmen in einer Ligation kompatible Enden, kann eine Religation stattfinden. Um diese zu verhindern, sollte eine Dephosphorylierung durchgeführt werden (siehe 2.3.8). Verwendet wird meist eine Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP), welche Phosphatgruppen am 3'- und 5'-Ende von DNA oder RNA entfernt.

1-20 pmol DNA-Enden werden im mitgelieferten Reaktionspuffer mit 1 U CIAP (MBI Fermentas) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wird die Lösung für 10 min auf 85 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt.

Neben der Dephosphorylierung kann DNA auch phosphoryliert werden, was sowohl bei der Verwendung synthetisch hergestellter Oligonukleotide in Klonierungen notwendig ist (siehe 2.3.7.1, 2.3.8 und 2.5.9.1) als auch bei der radioaktiven Markierung von DNA Anwendung findet (siehe 2.5.7.1). Synthetische Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende keine Phosphatgruppe, die für eine Ligation mit anderen DNA-Fragmenten unabdingbar ist. Das für

die Übertragungsreaktion der γ -Phosphatgruppe eines Nukleotidtriphosphat auf das 5'-Ende der DNA verwendete Enzym ist die T4-Polynukleotidkinase (PNK).

Die genaue Vorgehensweise der Phosphorylierung wird an entsprechender Stelle in den Kapiteln 2.3.7.1 (*Gapped duplex*-Mutagenese), 2.3.8 (Klonierung des Plasmids pUCMunI), 2.5.9.1 (Darstellung des Substrats pBR2Eco), sowie 2.5.7.1 (Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden) beschrieben.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer Lösung kann durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im UV-Bereich zwischen 220 und 320 nm ermittelt werden. Für DNA-Teilchen ab einer Größe von 200 bp kann ein gemittelter Extinktionskoeffizient aller vier Nukleotide A, G, T und C angenommen werden. So ergeben sich folgende spektroskopische Umrechnungen [Sambrook & Russell, 2001]:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} (\text{dsDNA}) \cong 50 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} (\text{ssDNA}) \cong 38 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$M_R (\text{bp dsDNA}) = 660 \text{ g mol}^{-1}$$

$$M_R (\text{b ssDNA}) = 330 \text{ g mol}^{-1}$$

Bei Oligonukleotiden kann die Berechnung der DNA-Konzentration nicht über den gemittelten Extinktionskoeffizienten erfolgen. Hier setzt sich der Extinktionskoeffizient aus der Summe der Koeffizienten ($\epsilon_{260\text{nm}}$) der einzelnen Nukleotide zusammen. Im folgendem sind die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide angegeben:

$$\epsilon_{260\text{nm}} (\text{dATP}) = 15,3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260\text{nm}} (\text{dGTP}) = 11,9 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260\text{nm}} (\text{dTTP}) = 9,3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260\text{nm}} (\text{dCTP}) = 7,4 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2.3.6 Elektrophoretische Trennung von DNA

Bei der Elektrophorese werden Moleküle mit unterschiedlicher Ladungsdichte in einer Matrix, an der ein elektrisches Feld anliegt, voneinander getrennt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt dabei nach Größe, da die Wanderungsgeschwindigkeit der linearen Fragmente annähernd dem Logarithmus ihres Molekulargewichts proportional ist. Abhängig von der Größe der DNA werden unterschiedliche Trägermaterialien in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Agarose, ein lineares Polysaccharid, das aus Seetang gewonnen wird, eignet sich für DNA-Fragmente mit einer Größe von mehr als 300 bp, Polyacrylamid für Fragmente, die kleiner als 500 bp sind.

Der Nachweis der DNA-Banden erfolgt durch Anfärben mit dem Interkalator Ethidiumbromid, wonach sie bei Anregung mit ultraviolettem Licht (312 nm) sichtbar werden (UV-Transilluminator Chema 4, Bachhofer). Für die Dokumentation wird das Dokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 (*Enhanced Analysis System*, Herolab) verwendet, die Bilder werden über einen Drucker (Mitsubishi *Video copy processor*) erhalten.

2.3.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Konzentration der verwendeten Agarosegele variiert von 0,8 % für Fragmente von λ -DNA (siehe 2.5.5), über 1 % als Standardkonzentration bis 1,3 % für Spaltkinetiken mit Plasmiden (siehe 2.5.6).

Die entsprechende Menge (w/v) an Agarose (Qualex Gold Agarose, AGS) wird in 100 mL TPE-Puffer (Laufpuffer) unter Erhitzen gelöst, kurz aufgeköcht und vor dem Erstarren in eine horizontale Elektrophoresekassette ($20 \times 10 \times 0,5 \text{ cm}^3$) gegossen. Anschließend wird das erstarrte Gel mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit Agaroseauftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels überführt.

Die elektrophoretische Trennung der Proben erfolgt bei 55 V und etwa 100 mA für zwei bis drei Stunden. Dabei wird das Gel gekühlt und der Puffer umgepumpt.

Zum Anfärben der DNA-Banden wird das Gel für 10 min in Ethidiumbromidlösung (etwa $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; Konzentration der Stammlösung ist 10 mg mL^{-1}) gegeben, anschließend in Wasser für 10 min wieder entfärbt und das Gel wie oben beschrieben dokumentiert.

TPE-Puffer:	900 mM	Tris
(10fach)	20 mM	EDTA
	pH 8,2 (H ₃ PO ₄)	
Agaroseauftragspuffer:	0,25 M	EDTA
(5fach)	1,2 % (w/v)	SDS
	25 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol FF

2.3.6.2 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Analyse von PCR-Produkten (siehe 2.5.8.1) und Fragmenten aus Restriktionsspaltungen (siehe 2.3.2) eignen sich native Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 6 bis 10 %. Als Gel- und Laufpuffer wird 0,5fach TTE verwendet. Die Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (AGS, Merck oder Roth) enthält 30 % Acrylamid und besitzt ein Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 37,5:1.

Die Gellösung wird nach Zugabe von TEMED und APS (je 1/500 des Gesamtvolumens der Gellösung) zwischen zwei Glasplatten (95 × 65 × 1 mm³) gegossen und nach Polymerisation in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die DNA-Proben werden mit PAGE-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei konstant 20 mA.

Zum Anfärben wird das Gel 10 min in Ethidiumbromidlösung (siehe 2.3.6.1) gegeben. Die Dokumentation erfolgt wie oben beschrieben (siehe 2.3.6).

TTE:	1,8 M	Tris
(20fach)	575 mM	Taurin
	2,7 mM	EDTA
PAGE-Auftragspuffer:	50 % (v/v)	Glycerin
(2fach)	0,2 % (w/v)	Azorubin
	in 1fach TTE	

2.3.7 Mutagenesestrategien zur Klonierung der *EcoRI*-Mutanten

Bei der Herstellung der *EcoRI*-Mutanten werden verschiedene Klonierungsstrategien und -wege verfolgt. Zum einen werden zunächst Ausgangsplasmide mit zusätzlichen Restriktionsspaltstellen im *ecoRI*-Gen erzeugt, zwischen die anschließend synthetisch hergestellte, hybridisierte Oligonukleotide mit den entsprechenden Mutationen ligiert werden können (siehe 2.3.7.2). Eine weitere Möglichkeit insbesondere der Erzeugung zielgerichteter Mehrfachmutanten besteht in dem Zusammenklonieren von DNA-Fragmenten verschiedener Plasmide, die die gewünschten Mutationen bereits enthalten (siehe 2.3.7.3). Zu diesem Zweck wird die bereits charakterisierte Mutante M137Q [Küster, 1998] neu kloniert, da bei der ersten Herstellung eine Spaltstelle als stille Mutation zerstört wurde, die für das Zusammenklonieren unabdingbar ist.

Die Herstellung der Mutante M137Q, sowie des Ausgangsplasmids mit zwei zusätzlichen Restriktionsspaltstellen erfolgt nach der unten beschriebenen *Gapped duplex*-Methode (siehe 2.3.7.1).

2.3.7.1 *Gapped duplex*-Mutagenese

Die *Gapped duplex*-Methode [Kramer *et al.*, 1984] ermöglicht das Einbringen zielgerichteter Mutationen in einen Vektor. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des Mutageneseprinzips.

Zur Einführung der Mutation wird ein synthetisch hergestelltes Oligonukleotid benötigt, welches die gewünschte Mutation trägt. Daneben sollte auch eine stille Mutation enthalten sein, die eine neue Restriktionsspaltstelle erzeugt oder eine vorhandene zerstört, dabei jedoch die Aminosäuresequenz nicht verändert. Die Spaltstelle dient zur Überprüfung des Mutageneseerfolgs und wird als *Screeningsite* bezeichnet.

Das zuvor phosphorylierte Mutageneseoligonukleotid wird mit einem Rahmen auf einzelsträngige Plasmid-DNA von pRIF309+(CH₆), die nach Superinfektion der plasmidhaltigen Bakterienzellen mit f1-Phagen erhalten wurde [Vennekohl, 1996], hybridisiert. Der Rahmen wird aus dem gleichen Plasmid pRIF309+(CH₆) durch Restriktionsspaltung (siehe 2.3.2) hergestellt und sollte den zu mutierenden Bereich minimal freihalten (*Gap*). Die verbliebenen einzelsträngigen Bereiche werden durch T7-DNA-Polymerase aufgefüllt (*Fill in*) und mit T4-DNA-Ligase kovalent geschlossen, so daß ein *Mismatch*-Plasmid resultiert, mit dem der reparaturdefiziente *E. coli*-Stamm WK6mutS(λ) (siehe 2.2.1) transformiert wird (siehe 2.2.5).

Nach der *in vivo*-Amplifikation enthalten theoretisch 50 % der Tochterplasmide die gewünschte Mutation.

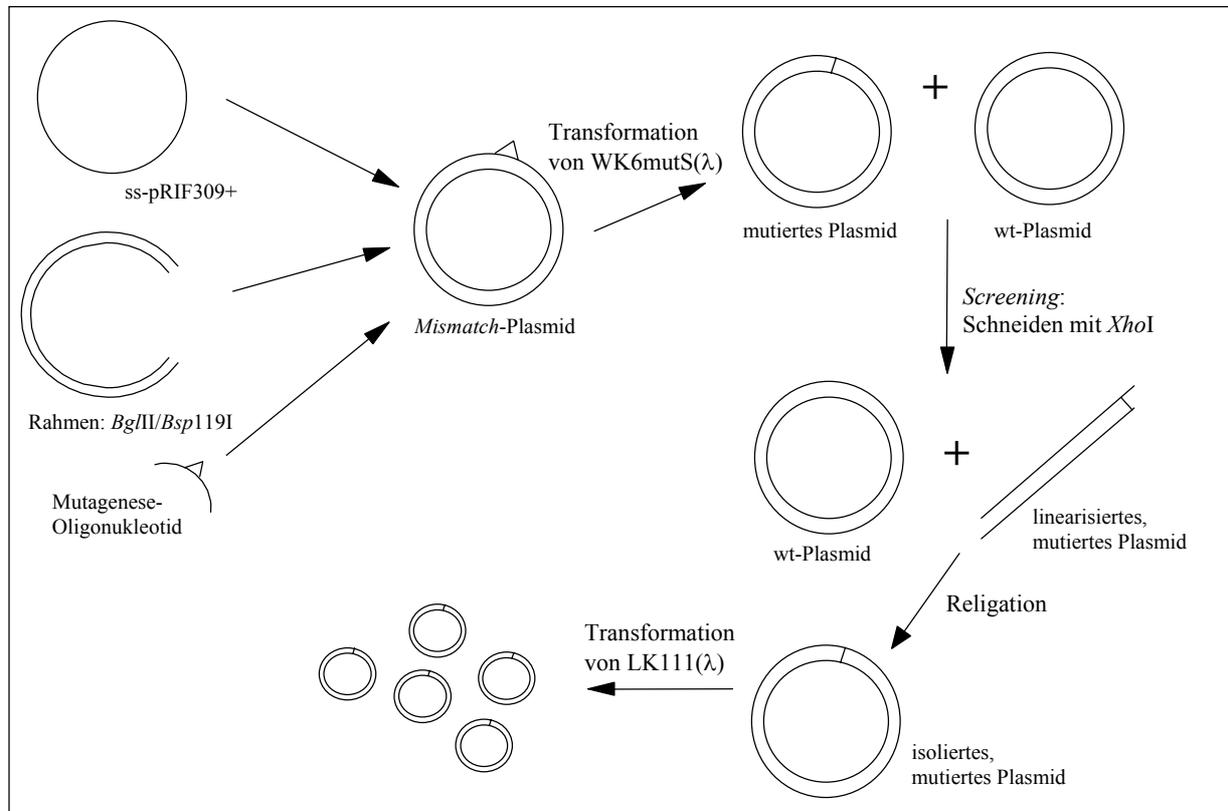


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der *Gapped duplex*-Mutagenese mit Einführung einer Restriktionsspaltstelle

Die Anreicherung positiver Klone erfolgt über die stille Mutation. Hierfür wird die gesamte Plasmid-DNA nach Isolierung mit dem entsprechenden *Screening*enzym gespalten (siehe 2.3.2), bei Einführung einer neuen Spaltstelle über ein Agarosegel elektrophoretisch von ungespaltener DNA getrennt (siehe 2.3.6.1), aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.1), religiert (siehe 2.3.3) und in den *E. coli*-Stamm LK111(λ) überführt (siehe 2.2.1 und 2.2.5). Bei Zerstörung einer Restriktionsspaltstelle durch die stille Mutation können LK111(λ)-Zellen direkt nach der Spaltung mit dem Ansatz transformiert werden.

Anschließend werden isolierte Plasmide einzelner Klone erneut auf die stille Mutation hin untersucht. Daraus hervorgehende positive Klone werden durch DNA-Sequenzierung (siehe 2.3.9) verifiziert, wobei allerdings nur das *ecoRI*-Gen überprüft wird.

Phosphorylierung der Mutageneseoligonukleotide

Ansatz: 2 μ L 10x *Eco*RI-Standard-Spaltpuffer
 2 μ L DTT (100 mM)
 1 μ L ATP (10 mM)
 1 μ L Oligonukleotid (20 μ M)
 5 U T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas)
 ad 20 μ L ddH₂O

Der Ansatz wird für 30-60 min bei 37 °C inkubiert, dann für 2 min auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Hybridisierung nach der *Gapped duplex*-Mutagenese

Ansatz: 4 μ L 10x Hybridisierungspuffer
 10 μ L phosphoryliertes Oligonukleotid (10 pmol)
 3 μ L ss-pRIF309+(CH₆) (0,5 pmol)
 10 μ L Rahmen (0,25 pmol)
 ad 40 μ L ddH₂O

Der Ansatz wird für 5 min auf 95 °C erhitzt, anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Auffüllreaktion (*Fill in*) und Ligation

Ansatz: 8 μ L 10x *Fill in*-Puffer
 40 μ L Hybridisierungsansatz
 7,5 U T7-DNA-Polymerase (MBI Fermentas)
 7,5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)
 ad 80 μ L ddH₂O

Der Ansatz wird für 5 min auf Eis gelagert und anschließend 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erhitzen für 10 min auf 65 °C zur Inaktivierung der Enzyme wird der Ansatz auf Eis abgekühlt.

*Eco*RI-Standard-Spaltpuffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5
 (10fach) 500 mM NaCl
 100 mM MgCl₂

Hybridisierungspuffer: (10fach)	100 mM 1,5 M	Tris/HCl pH 7,5 KCl
<i>Fill in</i> -Puffer (10fach)	275 mM 675 mM 150 mM 20 mM 500 µM 250 µM	Tris/HCl pH 7,5 KCl MgCl ₂ DTE ATP dNTPs

2.3.7.2 Klonierung von hybridisierten Oligonukleotiden

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung zielgerichteter *EcoRI*-Mutanten ist die Klonierung hybridisierter Oligonukleotide in einen entsprechend vorbereiteten, mit Restriktionsenzymen aufgeschnittenen Vektor. Die Oligonukleotide (siehe 2.3.7.4) sind dabei so beschaffen, daß ihre Enden kompatibel zu den durch Restriktionsspaltung erzeugten Enden des Vektors sind. Außerdem enthalten sie wie bei der *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7.1) bereits erwähnt eine stille Mutation zur Überprüfung des Mutageneseerfolgs. Die Vektoren mit den zusätzlichen Spaltstellen an geeigneten Positionen im *ecoRI*-Gen sind zuvor durch *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7.1) bzw. Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten (siehe 2.3.7.3) hergestellt worden.

Mit dieser Methode werden die Einzelmutanten M137C, M137K, M137L, M137N, R200K, R200Y und R203K und die Mehrfachmutanten M137A/A138G/A139R, M137A/A138G/A139R/R200K, R200K/R203K und R200Y/R203K generiert.

Zunächst erfolgt die Herstellung des Rahmens. Dafür wird der Vektor mit zwei Restriktionsenzymen präparativ gespalten (siehe 2.3.2), über ein Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe 2.3.6.1) und aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.1). Anschließend werden die komplementären Oligonukleotide (siehe 2.3.7.4) in äquimolarer Menge im Hybridisierungspuffer (siehe 2.3.7.1) hybridisiert (5 min 95 °C, abkühlen lassen).

Für die Ligation (siehe 2.3.3) werden 100-200 ng Rahmen eingesetzt und die hybridisierten Oligonukleotide äquimolar dazugegeben. Mit dem Reaktionsansatz werden Zellen des *E. coli*-Stamms LK111(λ) transformiert (siehe 2.2.5).

Isolierte Plasmide einzelner Klone werden daraufhin untersucht, ob die stille Mutation enthalten ist. Positive Klone werden durch DNA-Sequenzierung des *ecoRI*-Gens (siehe 2.3.9) verifiziert.

2.3.7.3 Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten

Die Erzeugung von Mehrfachmutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* wird oft dadurch vereinfacht, daß bereits Plasmide mit den jeweiligen Einfachmutationen existieren. So lassen sich durch gezieltes Ausschneiden von Plasmidfragmenten mit Restriktionsenzymen und anschließendes Zusammensetzen Mehrfachmutanten generieren.

In der vorliegenden Arbeit werden mit dieser Methode die Mutanten M137Q/R200K, M137Q/R200Y, M137Q/R203K, M137Q/R200K/R203K, M137Q/R200Y/R203K und M137A/A138G/A139R/R203K, sowie zwei Ausgangsplasmide für die Klonierung von hybridisierten Oligonukleotiden (siehe 2.3.7.2) hergestellt.

Zunächst erfolgt die Herstellung des Rahmens und des *Inserts*. Dafür werden die entsprechenden Plasmide mit denselben zwei Restriktionsenzymen präparativ gespalten (siehe 2.3.2), die Fragmente über ein Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe 2.3.6.1) und die entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.1).

In der nachfolgenden Ligationsreaktion (siehe 2.3.3) werden 100-200 ng Rahmen mit der äquimolaren Menge an *Insert* zusammengegeben und LK111(λ)-Zellen (siehe 2.2.1) mit dem Reaktionsansatz transformiert (siehe 2.2.5).

Isolierte Plasmide einzelner Klone werden auf die verschiedenen stillen Mutationen hin untersucht. Daraus hervorgehende positive Klone werden durch DNA-Sequenzierung des *ecoRI*-Gens (siehe 2.3.9) verifiziert.

2.3.7.4 Mutageneseoligonukleotide

Die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Oligonukleotide sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Die Basen, die den gewünschten Aminosäureaustausch kodieren, sind fett gedruckt. Neu eingeführte Spaltstellen sind unterstrichen.

Tab. 2.3: Sequenzen der Oligonukleotide für die Klonierung der *EcoRI*-Mutanten

Oligonukleotid	Sequenz	Schnittstelle
EcoRI L192 XhoI	GGA AGG GTT GTT AAT <u>CTC GAG</u> TAT AAT TCT GG	<i>XhoI</i>
EcoRI G210 SphI	GCA GCT AAT TAT <u>GGC ATG CCT</u> ATA AAT AG	<i>SphI</i>
M137Q	GGA GAT CAA GAT TTA CAG GCT GCT GGT AAT <u>GCA ATT GAA</u> AGA TCT CAT	<i>MunI</i>
M137C hin	GT GAC CAA GAT TTA TGC GCT GCT GGT AAT <u>GCA ATT GAA</u> A	<i>MunI</i>
M137C rück	GA TCT TTC <u>AAT TGC</u> ATT ACC AGC AGC GCA TAA ATC TTG	<i>MunI</i>
M137K hin	GT GAC CAA GAT TTA AAG GCT GCT GGT AAT <u>GCA ATT GAA</u> A	<i>MunI</i>
M137K rück	GA TCT TTC <u>AAT TGC</u> ATT ACC AGC AGC CTT TAA ATC TTG	<i>MunI</i>
M137L hin	GT GAC CAA GAT TTA CTG GCT GCT GGT AAT <u>GCA ATT GAA</u> A	<i>MunI</i>
M137L rück	GA TCT TTC <u>AAT TGC</u> ATT ACC AGC AGC CAG TAA ATC TTG	<i>MunI</i>
M137N hin	GT GAC CAA GAT TTA AAT GCT GCT GGT AAT <u>GCA ATT GAA</u> A	<i>MunI</i>
M137N rück	GA TCT TTC <u>AAT TGC</u> ATT ACC AGC AGC ATT TAA ATC TTG	<i>MunI</i>
R200K hin	TC GAG TAT AAT <u>TCC GGA</u> ATA TTA AAT AAA TTA GAT CGA CTA <u>ACG GCC GCT</u> AAT TAT GGC ATG	<i>Kpn2I</i> <i>Eco52I</i>
R200K rück	CC ATA ATT AGC <u>GGC CGT</u> TAG TCG ATC TAA TTT ATT TAA TAT <u>TCC GGA</u> ATT ATA C	<i>Eco52I</i> <i>Kpn2I</i>
R203K hin	TC GAG TAT AAT <u>TCC GGA</u> ATA TTA AAT AGG TTA GAT AAA CTA <u>ACG GCC GCT</u> AAT TAT GGC ATG	<i>Kpn2I</i> <i>Eco52I</i>
R203K rück	CC ATA ATT AGC <u>GGC CGT</u> TAG TTT ATC TAA CCT ATT TAA TAT <u>TCC GGA</u> ATT ATA C	<i>Eco52I</i> <i>Kpn2I</i>
R200K/R203K hin	TC GAG TAT AAT <u>TCC GGA</u> ATA TTA AAT AAA TTA GAT AAA CTA <u>ACG GCC GCT</u> AAT TAT GGC ATG	<i>Kpn2I</i> <i>Eco52I</i>

Oligonukleotid	Sequenz	Schnittstelle
R200K/R203K rück	CC ATA ATT AGC GGC CGT TAG TTT ATC TAA TTT ATT TAA TAT TCC GGA ATT ATA C	<i>Eco52I</i> <i>Kpn2I</i>
R200Y hin	TC GAG TAT AAT TCC GGA ATA TTA AAT TAC TTA GAT CGA CTA ACG GCC GCT AAT TAT GGC ATG	<i>Kpn2I</i> <i>Eco52I</i>
R200Y rück	CC ATA ATT AGC GGC CGT TAG TCG ATC TAA GTA ATT TAA TAT TCC GGA ATT ATA C	<i>Eco52I</i> <i>Kpn2I</i>
R200Y/R203K hin	TC GAG TAT AAT TCC GGA ATA TTA AAT TAC TTA GAT AAA CTA ACG GCC GCT AAT TAT GGC ATG	<i>Kpn2I</i> <i>Eco52I</i>
R200Y/R203K rück	CC ATA ATT AGC GGC CGT TAG TTT ATC TAA GTA ATT TAA TAT TCC GGA ATT ATA C	<i>Eco52I</i> <i>Kpn2I</i>
M137A/A138G/ A139R hin	GT GAC CAA GAT TTA GCA GGT AGA GGT AAT GCA ATT GAA A	<i>MunI</i>
M137A/A138G/ A139R rück	GA TCT TTC AAT TGC ATT ACC TCT ACC TGC TAA ATC TTG	<i>MunI</i>

Die ersten drei Oligonukleotide werden in der *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7.1) zur Herstellung der Mutante M137Q, sowie des Plasmids pRIF309+(CH₆) mit zwei zusätzlichen Restriktionsspaltstellen (*XhoI* und *SphI*) im *ecoRI*-Gen (Oligonukleotide „*EcoRI* L192 *XhoI*“ und „*EcoRI* G210 *SphI*“) eingesetzt. Beide Plasmide dienen als Ausgangsvektoren für weitere Klonierungen.

Alle übrigen angegebenen Oligonukleotide werden hybridisiert („hin“ und „rück“) in ein entsprechendes Ausgangsplasmid kloniert (siehe 2.3.7.2).

2.3.8 Klonierung des Plasmids pUCMunI

Das Plasmid pUCMunI dient der Untersuchung des Spaltverhaltens der Dreifachmutante M137Q/R200Y/R203K. Es ist ein Abkömmling des Plasmids pUC8, aus dem die Erkennungssequenz für *EcoRI* deletiert und die für *MunI* inseriert ist.

Der erste Schritt zur Generierung des Plasmids pUCMunI besteht darin, die sich in der *Multiple cloning site* befindende Schnittstelle für *EcoRI* aus dem Plasmid pUC8 zu entfernen. Das erfolgt durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *PvuII*, welches zwei Spaltstellen

innerhalb des *lacZ*(α)-Fragments in einem Abstand von 300 bp besitzt und glatte Enden erzeugt. In diesen aufgeschnittenen und zuvor dephosphorylierten Vektor wird anschließend ein hybridisiertes, phosphoryliertes Oligonukleotid, das eine *MunI*-Schnittstelle trägt, kloniert. Die Selektion positiver Klone erfolgt durch Spaltung der eingebrachten Schnittstelle. Ein vorangestelltes *Blue/White-Screening* wirkt unterstützend. Hierbei kann allerdings nur eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Klone noch eine *EcoRI*-Schnittstelle besitzen oder nicht.

Für die Herstellung des Rahmens wird das Plasmid pUC8 mit dem Restriktionsenzym *PvuII* präparativ gespalten (siehe 2.3.2) und nach elektrophoretischer Trennung (siehe 2.3.6.1) aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.3.1). Im Anschluß folgt die Dephosphorylierung der Rahmen-DNA (siehe 2.3.4), um eine Religation während der Ligation zu vermeiden.

Das zu klonierende Oligonukleotidpaar „*MunI*-AT“ (siehe Tabelle 2.5), das ebenfalls in Spaltuntersuchungen Anwendung findet (siehe 2.5.7), wird zunächst in einem Ansatz phosphoryliert (siehe auch 2.3.4). Hierfür werden jeweils 5 pmol Oligonukleotid mit 1 mM ATP, 2 U PNK (MBI Fermentas) und 20 mM DTT im mitgelieferten Reaktionspuffer A für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die nachfolgende Hybridisierung der phosphorylierten Oligonukleotide wird in Hybridisierungspuffer (siehe 2.3.7.1) durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließendes Abkühlen auf RT durchgeführt.

Für die *Blunt end*-Ligation (siehe 2.3.3) werden etwa 100 ng dephosphorylierter Rahmen mit dem hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotid äquimolar zusammengegeben. Mit dem Reaktionsansatz werden Zellen des *E. coli*-Stamms LK111(λ) transformiert (siehe 2.2.5). Dabei erfolgt zur Selektion der Klone ein *Blue/White-Screening* auf zuvor mit IPTG (400 nmol) und X-Gal (800 μ g) beschichteten LB_{Amp}-Agarplatten. Blau gefärbte Klone sind negativ, weiß gefärbte Kolonien können das richtige Plasmid enthalten.

Isolierte Plasmide einzelner Klone werden auf die insertierte (*MunI*) bzw. deletierte (*EcoRI*) Spaltstelle hin untersucht (siehe 2.3.2). Daraus hervorgehende positive Klone werden durch Sequenzierung (siehe 2.3.9) verifiziert.

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der einzelnen Plasmide wurden bei den Firmen Biozym Diagnostik GmbH, GATC Biotech AG oder Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) in Auftrag gegeben. In Tabelle 2.4 sind die dafür verwendeten Sequenzierprimer angegeben.

Tab. 2.4: Sequenzen der *Primer* für die Sequenzierung der mutierten Plasmide

<i>Primer</i>	Sequenz
H239	TTCAAAGCAGAAGGC
H699	GATCAAGATTTAATGGCTG
R1	AGCCGGATCGATCCGAC
R6	ACTTGTTTGTTCATTTCTAGCCATTAA
<i>Shift 174 hin</i>	GTGCCACCTGACGTCTAAGA
468er hin	GGAATCTTGCACGCCCTCGC

Mit den *Primern* H239, H699, R1 und R6 kann das *ecoRI*-Gen sequenziert werden. Der *Primer* „*Shift 174 hin*“ dient der Überprüfung des neu hergestellten Plasmids pUCMunI (siehe 2.3.8) und der *Primer* „468er hin“ wird für das Plasmid pBR2Eco (siehe 2.5.9.1) benutzt.

2.4 Proteinisolierung

2.4.1 Fermentation

Die Produktion der *EcoRI*-Mutanten erfolgt durch Fermentation von TGE900(pEcoR4)-Zellen (siehe 2.2.1), die das Plasmid mit der entsprechenden Mutante enthalten, in einem Volumen von 10 L. Dabei werden 25-50 g feuchtes Pellet an Bakterienzellen gewonnen.

Zunächst wird das Fermentationsgefäß mit etwa 8 L entionisiertem Wasser befüllt und über Nacht bei 120 °C sterilisiert. Des weiteren werden über Nacht die entsprechenden Bakterienzellen in einer 1 L-Vorkultur bei 30 °C angezogen.

Der abgekühlte Fermenter wird an einen Thermostaten und eine Luftzufuhr angeschlossen, die Abluft wird durch zwei Waschflaschen mit einer desinfizierenden Lösung (4 % Kohrsolin, Bode Chemie) geleitet. Anschließend werden 1 L autoklaviertes LB-Medium (10fach), 1 g

Ampicillin, 0,3 g Chloramphenicol und etwa 2 mL Extran A-31 (Merck) als Entschäumer zugesetzt und der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Nach Animpfen des Fermenters mit der Vorkultur erfolgt die Anzucht der Zellen bei 30 °C unter regelmäßiger Kontrolle des pH-Werts bis zu einer Zelldichte von $OD_{600nm} = 1,5-2$. Nun werden dem Medium weitere Nährstoffe (jeweils 500 mL Glucose- und Peptonlösung, 200 g L^{-1}) zugesetzt und die Expression des Genprodukts durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C induziert. Nach zweistündiger Expression werden die Zellen sedimentiert ($8360 \times g$, 10min), in ST-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 50-100 mL PDL/500 mM NaCl aufgenommen.

Die so gewonnenen Zellen können direkt zur Aufarbeitung (siehe 2.4.2) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

ST-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0

 100 mM NaCl

PDL: 30 mM KP_i pH 7,5

 0,1 mM DTE

 0,01 % (v/v) Lubrol

2.4.2 Zellaufschluß

Es gibt verschiedene chemische und mechanische Methoden, um Zellen aufzuschließen. In dieser Arbeit wird der Zellaufschluß per Ultraschall durchgeführt.

Die resuspendierten Zellen aus der Fermentation werden 20mal für je 30 s beschallt (Branson Sonifier 250, Ultrasonics; *Duty cycle* 50 %, *Output control* Stufe 6; 30 s Pause). Dabei sollten die Zellen auf Eis gehalten und nach einigen Beschallungen durchmischt werden, um ein Aufheizen der Zellsuspension zu verhindern. Anschließend wird das Gemisch zentrifugiert ($16000-19700 \times g$, 70 min, 4 °C), so daß Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen sedimentieren. Aus dem klaren Zellysate kann das überexprimierte Protein durch chromatographische Verfahren (siehe 2.4.3) isoliert werden.

2.4.3 Chromatographische Verfahren

2.4.3.1 Affinitätschromatographie

Alle in dieser Arbeit erzeugten *EcoRI*-Mutanten besitzen einen am C-Terminus fusionierten Hexahistidin $_{tag}$, der eine affinitätschromatographische Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) ermöglicht. Die funktionellen Gruppen dieses Materials sind Ni²⁺-Ionen, die durch Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert und an eine Agarosematrix gebunden sind [Hochuli, 1990]. Die im Protein vorhandenen, frei zugänglichen Histidinreste können zwei der sechs Koordinationsstellen des Ni²⁺-Kations besetzen, so daß durch die Bindung eine Trennung von anderen Substanzen des Zellysats erfolgt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit imidazolhaltigem Puffer, das um die Bindungsplätze kompetiert und in hinreichend hoher Konzentration das Protein verdrängt. Durch geeignete Pufferbedingungen (hohe Ionenstärke: 0,5-1 M NaCl) kann bereits in diesem ersten Aufreinigungsschritt eine Verunreinigung des DNA-bindenden Proteins mit DNA vermieden werden.

2-2,5 mL Ni²⁺-NTA-Agarose werden mit 30 mL PDL/500 mM NaCl equilibriert. Das klare Zellysat (siehe 2.4.2), das zum Herabsetzen der Viskosität 1:4 mit Equilibrierungspuffer verdünnt wurde, wird hinzugegeben. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgt unter leichtem Rühren für mindestens 30 Minuten bei 4 °C.

Anschließend wird die Suspension in eine Säule überführt und zunächst mit dem zehnfachen Säulenvolumen Equilibrierungspuffer und danach mit dem zehnfachen Säulenvolumen PDL/500 mM NaCl/10 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgt mit steigender Imidazolkonzentration entweder über einen linearen Gradienten oder einen Stufengradienten.

Linearer Gradient: Die Elution wird mit einem Gradienten von 10 bis 150 mM Imidazol (in PDL/500 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 100 mL durchgeführt, wobei das Eluat in Fraktionen zu je 4 mL aufgefangen wird.

Zusätzlich erfolgt die Elution mit dem vierfachen Säulenvolumen an 250 mM Imidazol (in PDL/500 mM NaCl).

Stufengradient: Die Elution wird in folgenden Stufen durchgeführt (Imidazol jeweils in PDL/500 mM NaCl):

50 mM Imidazol 15 Säulenvolumina

75 mM Imidazol	10 Säulenvolumina
150 mM Imidazol	10 Säulenvolumina
250 mM Imidazol	5 Säulenvolumina
350 mM Imidazol	5 Säulenvolumina

Die Überprüfung des Proteingehalts von Durchlauf, Waschfraktion, Eluat und Säulenmaterial erfolgt auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 2.5.2). Aufgrund ihres geringen Proteingehalts werden von den Eluatfraktionen aliquote Teile zu je 100 μ L wie unter 2.5.2 beschrieben mittels Trichloressigsäure-Fällung vorbereitet. Proben des Durchlaufs, der Waschfraktionen und des Säulenmaterials werden ohne vorherige Proteinfällung auf dem Gel analysiert.

Fraktionen, die das zu isolierende Protein enthalten, werden vereinigt und in einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie (siehe 2.4.3.2) weiter aufgereinigt.

PDL: 30 mM KP_i pH 7,5
 0,1 mM DTE
 0,01 % (v/v) Lubrol

2.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Das über die Affinitätssäule vorgereinigte Protein wird zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung über eine Ionenaustauschersäule aus Phosphocellulose (P-Cell, Whatman) von Verunreinigungen getrennt. Da *EcoRI* ein DNA-bindendes Protein ist, geht es wesentlich stärkere Bindungen mit den Phosphatgruppen der Phosphocellulose ein als andere Proteine. DNA kann aufgrund ihrer negativen Ladung nicht binden, so daß eine quantitative Abtrennung möglich ist.

2-3,5 mL Phosphocellulose werden mit zehn Säulenvolumina PEDL/100 mM NaCl equilibriert. Die vereinigten *EcoRI*-haltigen Fraktionen der Affinitätschromatographie (siehe 2.4.3.1), werden mit PEDL-Puffer zum Herabsetzen der Leitfähigkeit und der NaCl-Konzentration 1:5 verdünnt und anschließend zu der equilibrierten Phosphocellulose gegeben. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgt unter leichtem Rühren für mindestens 30 Minuten bei 4 °C.

Anschließend wird die Suspension in eine Säule überführt und mit dem zehnfachen Säulenvolumen Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgt über einen Stufengradienten mit steigender NaCl-Konzentration (jeweils in PEDL-Puffer), wobei je nach Menge und Sauberkeit des vorgereinigten Proteins sowohl die Säulenvolumina als auch die durchgeführten Elutionsschritte variiert werden.

Stufengradient:	330 mM NaCl	10-15 Säulenvolumina
	500 mM NaCl	7-10 Säulenvolumina
	660 mM NaCl	5-10 Säulenvolumina
	1000 mM NaCl	1,5-3 Säulenvolumina
	1330 mM NaCl	1,5-4 Säulenvolumina
	1660 mM NaCl	1,5-3 Säulenvolumina
	2000 mM NaCl	1,5-3 Säulenvolumina

Die Überprüfung des Proteingehalts von Durchlauf, Waschfraktion, Eluat und Säulenmaterial erfolgt auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 2.5.2). Hierfür werden von allen Fraktionen mit Ausnahme des Säulenmaterials aliquote Teile zu je 100 µL wie unter 2.5.2 beschrieben mittels Trichloressigsäure-Fällung vorbereitet. Proben des Säulenmaterials werden ohne vorherige Proteinfällung auf dem Gel analysiert.

Fraktionen, die das zu isolierende Protein enthalten, werden zur Umpufferung und Konzentrierung dialysiert (siehe 2.4.4).

PEDL:	30 mM	KP _i pH 7,5
	1 mM	EDTA
	0,1 mM	DTE
	0,01 % (v/v)	Lubrol

2.4.4 Dialyse von Proteinlösungen

Zur dauerhaften Lagerung von Proteinen sowie zur Konzentrierung werden wäßrige Lösungen gegen glycerinhaltigen Puffer dialysiert.

Die aufgereinigten Proteinfractionen aus der Ionenaustauschchromatographie (siehe 2.4.3.2) werden über Nacht bei 4 °C in Dialyseschläuchen mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 12-14 kDa (VISKING, Serva) gegen Dialysepuffer dialysiert. Hierbei werden in einem

Puffervolumen von 500 mL maximal 30 mL wäßrige Proteinlösung konzentriert. In dem unten angegebenen Dialysepuffer wird eine Konzentrierung um etwa Faktor fünf erreicht. Die Lagerung der Proteine erfolgt anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dialysepuffer: 70 % (v/v) Glycerin
300 mM NaCl
in PDL-Puffer

2.5 Charakterisierung der *EcoRI*-Mutanten

2.5.1 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der dialysierten *EcoRI*-Proteine wird ein Absorptionsspektrum im UV-Bereich zwischen 220 und 320 nm aufgenommen (UV/VIS Spectrophotometer V-560, JASCO). Die Messung erfolgt bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) gegen Dialysepuffer als Blindwert. Die Konzentration ergibt sich aus der Berechnung mit dem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{278\text{nm}} = 5,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das *EcoRI*-Wildtypenzym [in gebräuchliche Einheiten umgerechneter Wert von Modrich & Zabel, 1976] und wird für die Proteinvarianten als identisch angenommen.

2.5.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli

Bei dieser Elektrophorese-Methode nach Laemmli (1970) werden Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol in einem diskontinuierlichen Puffersystem unabhängig von ihrer eigenen Ladung nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele bestehen aus einem 17,5 %igen Trenngel und einem 6 %igen Sammelgel, welches durch einen vom Trenngel abweichenden pH-Wert die Bandenschärfe erhöht. Die Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (AGS, Merck oder Roth) enthält 30 % Acrylamid und besitzt ein Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 37,5:1.

Probenvorbereitung

Probenvolumina bis 20 μL mit ausreichender Proteinkonzentration werden direkt ohne Aufkonzentrierung in der Elektrophorese eingesetzt. Andere Proben, wie zum Beispiel die

Eluatfraktionen aus der chromatographischen Aufreinigung der *EcoRI*-Mutanten (siehe 2.4.3), werden zur Konzentrierung mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierzu wird die Probe mit dem gleichen Volumen an 20 %iger TCA (w/v) versetzt, gut gemischt, etwa 10 min bei 4 °C inkubiert und der Niederschlag durch Zentrifugation sedimentiert (14000 × g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wird entfernt und das Präzipitat in 8 µL Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert. Zur Neutralisation der Lösung werden 3 µL BisTris (2 M) zugegeben.

Herstellung des Gels und Elektrophorese

Das zwischen zwei Glasplatten (95 × 65 × 1 mm³) gegossene diskontinuierliche Gel wird nach Polymerisation in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proteinproben werden mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt, für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels überführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei konstanter Stromstärke (30 mA) bis der Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel gelaufen ist (etwa 1 bis 1,5 h).

Der Proteinnachweis erfolgt durch Anfärben des Gels mit Laemmli-Färbelösung. Hierzu wird das Gel kurz in der Färbelösung aufgekocht und durch anschließendes Kochen in 7 %iger (v/v) Essigsäure wieder soweit entfärbt, daß nur noch die Färbung der Proteinbanden erhalten bleibt und der Hintergrund farblos erscheint. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei etwa 10 ng. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit E.A.S.Y.

Elektrodenpuffer:	250 mM	Tris
(10fach)	1 % (w/v)	SDS
	1,9 M	Glycin
	pH ≈ 8,3 (nicht einstellen)	
Trenngel 17,5 %:	17,5 % (w/v)	AA/BisAA (37,5:1)
	420 mM	Tris/HCl pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS
Sammelgel 6 %:	6 % (w/v)	AA/BisAA (37,5:1)
	125 mM	Tris/HCl pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS

Laemmli-Auftragspuffer: (2fach)	160 mM	Tris/HCl pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	Mercaptoethanol
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
	16 % (w/v)	Saccharose
Laemmli-Färbelösung:	0,2 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva)
	0,05 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva)
	42,5 % (v/v)	Ethanol
	5 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

2.5.3 Western blot (Immunoblot)

Der spezifische Nachweis der aufgereinigten Proteine erfolgt über einen *Western blot* mit nachfolgender Immundetektion mit einem polyklonalen Antikörper (*Rabbit anti EcoRI*, [Fritz, 1994]). Dafür werden die Proteine nach gelelektrophoretischer Trennung (siehe 2.5.2) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, ImmobilonTM, Firma Millipore) übertragen und immobilisiert, um sie für den Antikörper zugänglich zu machen. Der primäre Antikörper wird durch einen zweiten mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper (*Goat anti rabbit IgG*, Sigma) erkannt, welcher den Nachweis der Banden durch eine Farbreaktion ermöglicht.

In dieser Arbeit wird als *Blotmethode* das *Tankblotting* eingesetzt. Hierfür wird die PVDF-Membran zunächst mit 30 %igem Methanol benetzt und anschließend mit Wasser gewaschen. Nun werden die Membran sowie vierzehn *Blotpapier* (GB003, Schleicher & Schuell) und das Laemmligel mit den aufgetrennten Proben (siehe 2.5.2) in *Blotpuffer* equilibriert. Anschließend wird der *Transfersandwich*, bestehend aus sieben Lagen *Blotpapier*, Laemmligel, Membran und sieben Lagen *Blotpapier*, zusammengestellt und in eine Kammer, welche in den mit *Blotpuffer* gefüllten Tank gehängt wird, eingebettet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt für ein Laemmligel der Größe $95 \times 65 \times 1 \text{ mm}^3$ bei 250 mA und 40 V für 60 min. Im Anschluß an das *Blotting* kann die Transfereffizienz mittels Laemmli-Färbelösung (siehe 2.5.2) und eines farbigen Proteinstandards (*RainbowTM Coloured Protein Molecular Weight Marker*, Amersham Biosciences) überprüft werden.

Zur Vorbereitung auf die Immundetektion wird die PVDF-Membran zunächst mit 20 mL TBS/3 % Magermilchpulver für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C präinkubiert, um unspezifische Bindungsplätze zu blockieren. Anschließend wird sie mit TBS-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen *EcoRI*) in 20 mL TBS/1 % Magermilchpulver für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper (*Goat anti rabbit IgG* gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) unter denselben Bedingungen wird die Membran jeweils zweimal mit je 20 mL TBS/0,05 % Tween und dreimal mit je 20 mL TBS gewaschen. Anschließend wird die Membran in die Färbelösung überführt und die Farbreaktion mit 50 µL 30 %igem Wasserstoffperoxid gestartet. Das Stoppen der Reaktion bei ausreichender Färbung erfolgt durch Zugabe von Wasser.

<i>Blot</i> puffer:	250 mM	Tris
(10fach)	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
TBS-Puffer:	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
(10fach)	1,5 M	NaCl
	10 mM	EDTA
Färbelösung:	1 Spatelspitze	Co(II)Cl ₂
	1 Spatelspitze	3,3-Diaminobenzidin*4HCl*2H ₂ O
	100 mL	TBS

2.5.4 Circular dichroismus-Spektroskopie

Zur Ermittlung der Sekundärstruktur der *EcoRI*-Proteine werden Circular dichroismus-Spektren mit einem Jobin Yvon Dichrograph R. J. Mark III zwischen 200 und 250 nm in einer Küvette der Schichtdicke 0,01 bzw. 0,05 cm aufgenommen. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm CDPro [Sreerama & Woody, 2000], das durch Vergleich mit Standardspektren den prozentualen Anteil an α -Helix und β -Faltblatt ermittelt.

2.5.5 Bestimmung der Spaltaktivität mit λ -DNA

Für die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität von *EcoRI*-Mutanten wird λ -DNA (*cI857 ind1 Sam7*) als Standardsubstrat verwendet. λ -DNA hat eine Länge von 48502 bp und wird von *EcoRI* unter Standardbedingungen an fünf Positionen gespalten. Dabei entstehen DNA-Fragmente der Länge 21226 bp, 7421 bp, 5804 bp, 5643 bp, 4878 bp und 3530 bp. Das Auftreten dieser charakteristischen Fragmente nach einer Spaltung wird auch als kanonisches Spaltmuster bezeichnet. Bei einem kinetischen Reaktionsverlauf lassen sich anhand der Entwicklung des Bandenmusters zusätzliche Aussagen über Spezifität der Mutanten oder bevorzugte Spaltgeschwindigkeiten an einzelnen Spaltstellen treffen.

Die spezifische Aktivität wird bezogen auf den Proteingehalt in U mg^{-1} angegeben und läßt sich anhand des Zeitwerts, zu dem die Spaltung beendet ist bzw. alle spezifischen Spaltstellen vollständig gespalten sind, mit der Formel (1) unter der Bedingung, daß ein Spaltansatz in einem Volumen von 15 μL 250 ng λ -DNA enthält, berechnen.

$$\text{spez. Aktivität} [\text{U mg}^{-1}] = \frac{1000}{t \cdot c(\text{E}) \cdot M_{\text{R}}} \quad (1)$$

mit: t Zeitwert, zu dem die Spaltung beendet ist [min]
 c(E) Enzymkonzentration im Test [M]
 M_R Molekulargewicht Enzym [g mol^{-1}]

Die Einheit U ist definiert als die Menge Protein, die 1 μg λ -DNA innerhalb einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen in einem Reaktionsvolumen von 60 μL vollständig spaltet.

Die Spaltung der λ -DNA wird unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt. Neben Standardbedingungen mit 50 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 bei einem pH-Wert von 7,5 finden auch sogenannte *Starbedingungen* Anwendung. Diese relaxierenden Bedingungen erlauben ein Spalten von sogenannten *Starspaltstellen*, die in einem Basenpaar von der spezifischen Erkennungssequenz abweichen. Erreicht werden kann diese *Starspaltung* durch Ersetzen der Magnesiumionen mit Manganionen, Erhöhung des pH-Werts auf 8,8 in Verbindung mit Reduzierung der NaCl- und MgCl_2 -Konzentration auf ein Zehntel der Standardkonzentration oder durch Zugabe von Glycerin oder organischen Lösungsmitteln. Die letzte Möglichkeit findet in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung.

Die vierte zu testende Pufferbedingung ist die unter Hochsalz-Spaltpuffer. Der Puffer besitzt dieselbe Zusammensetzung wie der Standard-Spaltpuffer, allerdings bei einem pH-Wert von 8,8 wie unter Niedrigsalz-*Star*bedingungen.

Der Spaltansatz enthält pro 15 µL-Aliquot 250 ng λ-DNA (Boehringer Mannheim, MBI Fermentas oder New England Biolabs) in dem entsprechenden Spaltpuffer der einfachen Konzentration. Die Reaktion wird durch Zugabe einer definierten Menge Enzym gestartet und bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wird ein Aliquot von 15 µL entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 µL Agaroseauftragspuffer gestoppt. Nach Fertigstellung der Kinetik werden die Proben auf einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe 2.3.6.1).

Verdünnungen der Enzyme werden mit 20 mM Tris/HCl des entsprechenden pH-Werts hergestellt.

Abweichende Reaktionsbedingungen werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

Standard-Spaltpuffer: (10fach)	200 mM 500 mM 100 mM	Tris/HCl pH 7,5 NaCl MgCl ₂
Mangan-Spaltpuffer: (10fach)	200 mM 500 mM 10 mM	Tris/HCl pH 7,5 NaCl MnCl ₂
Niedrigsalz-Spaltpuffer: (10fach)	200 mM 50 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8,8 NaCl MgCl ₂
Hochsalz-Spaltpuffer: (10fach)	200 mM 500 mM 100 mM	Tris/HCl pH 8,8 NaCl MgCl ₂

Agaroseauftragspuffer:	0,25 M	EDTA
(5fach)	1,2 % (w/v)	SDS
	25 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol FF

2.5.6 Spaltuntersuchungen mit Plasmiden

Neben der Bestimmung der spezifischen Aktivität der *EcoRI*-Mutanten mit λ -DNA werden deren Spalteigenschaften auch mit Plasmiden als Substrat näher untersucht.

Hierfür werden die vier Plasmide pBR322, pRIF309+, pUC8 und pUCMunI (siehe 2.2.3) verwendet. pBR322 und pUC8 besitzen jeweils eine *EcoRI*-Spaltstelle, auf pRIF309+ befinden sich drei. Das selbst hergestellte Plasmid pUCMunI (siehe 2.3.8) enthält eine *MunI*-Spaltstelle, jedoch keine *EcoRI*-Spaltstelle.

Es werden dieselben Pufferbedingungen wie bei den Untersuchungen mit λ -DNA angewendet (siehe 2.5.5).

Für die Spaltung werden 8-20 nM Plasmid-DNA mit einer definierten Menge Enzym im einfachkonzentrierten Spaltpuffer (siehe 2.5.5) bei 37 °C inkubiert. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von 5 μ L Agaroseauftragspuffer (siehe 2.5.5) gestoppt. Bei kinetischen Untersuchungen wird nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit ein Aliquot entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 μ L Agaroseauftragspuffer (siehe 2.5.5) gestoppt. Die Analyse der Proben erfolgt abhängig von dem zu spaltenden Plasmid auf einem 1,0-1,3 %igen Agarosegel (siehe 2.3.6.1).

Enzymverdünnungen werden mit 20 mM Tris/HCl des entsprechenden pH-Werts hergestellt.

Abweichende Reaktionsbedingungen werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

2.5.7 Spaltuntersuchungen mit Oligodesoxynukleotiden

Zur weiteren Untersuchung der katalytischen Aktivität der *EcoRI*-Mutanten werden Kinetiken und Spaltungen mit verschiedenen nicht selbstkomplementären Oligodesoxynukleotiden durchgeführt. Hierbei findet standardmäßig das Oligonukleotidpaar B/C Anwendung. Es ist 29 Basenpaare lang und enthält zentral eine *EcoRI*-Erkennungssequenz. Weitere zur Spaltung eingesetzte Oligopaare sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Sequenzen der Oligonukleotide für Spaltuntersuchungen

Name	Sequenz
B	GGTTGAGTCCGGAATTCTAGATATCTTGG
C	CCAAGATATCTAGAATTCGGACTCAACC
EcoRI hin	GATCGAATTCGTGGAC
EcoRI rück	GTCCACGAATTCGATC
EcoRI _{meth} hin	GAT5metCGAATT5metCGTGGAC
EcoRI _{meth} rück	GTCCA5metCGAATT5metCGATC
MunI-AT hin	GATACAATTGTCGGAC
MunI-AT rück	GTCCGACAATTGTATC
V1 hin	GATCTAATTACTGGAC
V1 rück	GTCCAGTAATTAGATC
V2 hin	GATCAAATTTCTGGAC
V2 rück	GTCCAGAAATTTGATC

Die Detektion der Oligonukleotide und deren Spaltprodukte erfolgt über die vorherige radioaktive Markierung am 5'-Ende der DNA (siehe 2.5.7.1) mit dem Phosphoimager der Firma Fuji (BAS 1000 bio imager). Dieses Detektionssystem ist sehr empfindlich und ermöglicht den Nachweis geringster Mengen gespaltener DNA.

Die Spaltung der hybridisierten Oligonukleotide wird unter Pufferbedingungen analog zu den Spaltungen von λ -DNA (siehe 2.5.5) durchgeführt. Dabei ist entweder nur ein Strang des DNA-Hybrids markiert (Oligopaar B/C) oder Hin- und Rückstrang, so daß zwei sichtbare Spaltprodukte entstehen. Die Trennung von Substrat und Produkten im Anschluß an die Spaltung erfolgt elektrophoretisch in einem denaturierenden 18 %igen Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff.

Aus einem kinetischen Reaktionsverlauf kann über die Anfangsumsatzgeschwindigkeit die Geschwindigkeitskonstante k_{app} bestimmt werden.

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide (siehe 2.5.7.1) werden jeweils mit ihrem komplementären Partner in äquimolarer Menge hybridisiert (5 min 95 °C, abkühlen lassen).

Für die Spaltung werden üblicherweise 500 nM Oligonukleotid im einfachkonzentrierten Spaltpuffer (siehe 2.5.5) verwendet. Die Menge an Enzym ist variabel einsetzbar. Genaue Angaben über die jeweiligen Konzentrationen und Pufferbedingungen werden an

entsprechender Stelle aufgeführt. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 5 μL PAA-Auftragspuffer. Bei Spaltkinetiken wird nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit ein Aliquot von 10 μL entnommen und durch Zugabe von 5 μL PAA-Auftragspuffer gestoppt.

Nach der elektrophoretischen Trennung (etwa 1 bis 1,5 h) in einem denaturierenden 18 %igen Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff ($20 \times 20 \times 0,1 \text{ cm}^3$) bei konstant 30 mA mit 0,5fach TTE als Gel- und Laufpuffer (30 min Vorlauf) wird das Gel zur Entfernung des Harnstoffs für etwa 30 Minuten in 10 %ige Essigsäure gelegt und anschließend auf *Blot*papier (GB003, Schleicher & Schuell) unter Vakuum getrocknet.

Die Quantifizierung der Intensität der entsprechenden Banden erfolgt mit dem Phosphoimager BAS 1000 bio imager und dem Auswerteprogramm MacBAS 2.4 der Firma Fuji. Aus den so erhaltenen Daten läßt sich eine Umsatzkurve erstellen, aus der mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit die Geschwindigkeitskonstante k_{app} berechnet werden kann.

TTE:	1,8 M	Tris
(20fach)	575 mM	Taurin
	2,7 mM	EDTA
PAA-Auftragspuffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
(2fach)	50 mM	EDTA
	50 % (v/v)	Glycerin
	0,2 % (w/v)	Azorubin
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,2 % (w/v)	Xylencyanol FF

2.5.7.1 Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden

Synthetische Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende keine Phosphatgruppe. So können sie leicht mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) durch Phosphorylierung radioaktiv markiert werden. Benötigt wird hierfür nur ein Nukleotidtriphosphat mit dem entsprechenden Isotop in γ -Position, das auf das Oligonukleotid übertragen wird. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das Isotop ^{32}P verwendet.

1-7 nmol Oligonukleotid werden mit 10 μCi [γ - ^{32}P]ATP (Amersham Biosciences), 2 U PNK (MBI Fermentas) und 1 mM DTT im mitgelieferten Reaktionspuffer A für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der Oligonukleotide mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Konzentration wird durch Aufnahme eines UV-Spektrums bestimmt (siehe 2.3.5).

2.5.7.2 Auswertung von Oligokinetiken nach Michaelis-Menten

Zur Bestimmung von Michaelis-Menten-Parametern der Spaltung der Oligonukleotidpaare „EcoRI“ und „EcoRI_{meth}“ werden zunächst bei verschiedenen Substratkonzentrationen zwischen 25 und 1500 nM die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} (Spaltungen pro Enzymmolekül) ermittelt. Die Enzymkonzentration von 5 bis 50 nM wird dabei je nach Substratkonzentration variabel eingesetzt. Die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten werden anschließend durch Multiplikation mit einer konstanten Enzymkonzentration von 5 nM in Anfangsgeschwindigkeiten v_0 mit der Einheit $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ umgerechnet und diese gegen die Substratkonzentration $c(\text{S})$ aufgetragen. An diese Meßpunkte wird nun mit Hilfe des *Solvers* des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 97 eine Kurve nach der Michaelis-Menten-Gleichung (2) angepaßt.

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot c(\text{S})}{K_{\text{M}} + c(\text{S})} \quad (2)$$

mit: v_0 Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion
 $c(\text{S})$ Substratkonzentration
 v_{max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 K_{M} Michaelis-Menten-Konstante

Die Anpassung beruht auf einer Iteration, bei der die Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_{M} und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} so verändert werden, daß die Summe der Quadrate des auf die Enzymkonzentration normierten Fehlers zwischen praktisch ermittelter und theoretisch berechneter Anfangsgeschwindigkeit minimal wird. Die dafür benötigte theoretische Anfangsgeschwindigkeit wird mit der Michaelis-Menten-Gleichung (2) mit den veränderbaren Werten für K_{M} und v_{max} berechnet.

Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} wird im Anschluß an die Anpassung durch Division der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} mit der als konstant gesetzten Enzymkonzentration (hier 5 nM) berechnet.

2.5.8 Gelretardationsexperimente (*Mobility shift assay*)

Diese Methode dient zur Bestimmung der Bindungskonstante K_{ass} eines Proteins an DNA. Grundlegend dabei ist das veränderte Laufverhalten (Retardation) von proteingebundener DNA im Vergleich zu freier DNA in einem nativen Gel. Bei Verwendung eines radioaktiv markierten DNA-Substrats kann durch Quantifizierung der freien und gebundenen DNA bei einer gegebenen Proteinkonzentration die Bindungskonstante berechnet werden.

Für die Bestimmung der Bindungskonstante der *EcoRI*-Mutanten werden drei verschiedene *Shift*substrate verwendet, ein 174 bp und ein 468 bp langes PCR-Produkt und das Oligonukleotidpaar B/C (siehe 2.5.7). Sie enthalten jeweils eine *EcoRI*-Erkennungssequenz. Die PCR-Produkte (siehe 2.5.8.1) sind intern mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ und das Oligopaar B/C am 5'-Ende durch PNK (siehe 2.5.7.1) radioaktiv markiert.

2.5.8.1 Darstellung der PCR-*Shift*substrate

Die Darstellung der 174 bp und 468 bp langen *Shift*substrate erfolgt durch Amplifikation in der *Polymerase chain reaction* (PCR). Dabei wird für das 174er Produkt das Plasmid pBR322 (siehe 2.2.3) und für das 468er Produkt das Plasmid pBR2Eco (siehe 2.2.3) als *Template* verwendet. In Tabelle 2.6 sind die verwendeten *Primer* aufgeführt, nachfolgend ist der Ansatz für die PCR aufgelistet.

Tab. 2.6: Sequenzen der PCR-*Primer* für die Herstellung der *Shift*substrate

<i>Primer</i>	Sequenz
<i>Shift</i> 174 hin	GTGCCACCTGACGTCTAAGA
<i>Shift</i> 174 rück	ATACACGGTGCCTGACTGCG
468er hin	GGAATCTTGCACGCCCTCGC
468er rück	GTTAGCGAGGTGCCGCCGG

PCR-Ansatz:	10 µL	10x PCR-Puffer (Qiagen)
	10 µL	dNTP-Lösung (je 2 mM)
	1 µL	<i>Primer</i> hin (100 µM)
	1 µL	<i>Primer</i> rück (100 µM)
	10 µL	<i>Template</i> (100 ng)
	1 µL	[α - ³² P]dATP (10 µCi µL ⁻¹ , Amersham Biosciences)
	10 U	<i>Taq</i> DNA Polymerase (Qiagen)
	ad 100 µL ddH ₂ O	

Die Bedingungen der PCR zur Amplifikation der *Shift*substrate sind in Tabelle 2.7 beschrieben. Da die Temperatur während der *Annealing*phase für die *Shift*substrate unterschiedlich ist, sind in der Tabelle zwei Werte angegeben. Der erste (58 °C) gilt für die Amplifikation des 468er Produkts, der zweite (63 °C) für das 174er Produkt.

Tab. 2.7: PCR-Bedingungen für die Herstellung der *Shift*substrate

	Zyklenanzahl	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [s]
Denaturierung	1×	92	300
Amplifikation	35×	92	60
		58 / 63	90
		72	60
finale Extension	1×	92	60
		58 / 63	90
		72	300

Im Anschluß an die PCR werden die Produkte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration durch Aufnahme eines UV-Spektrums bestimmt (siehe 2.3.5).

2.5.8.2 *Mobility shift assay*

Zur Bestimmung der Bindungskonstante der *EcoRI*-Mutanten werden zu einer gleichbleibenden Substratkonzentration von 1 nM für die PCR-*Shift*substrate bzw. 10 nM für das

Oligonukleotidpaar B/C jeweils unterschiedliche Mengen an Enzym in einem Verhältnis von 50:1 bis 1:1 (Enzym:Substrat) gegeben und im Bindungspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µL für 30 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz enthält 10 % (v/v) Glycerin, so daß die Proben ohne weitere Behandlung direkt auf ein natives 6 %iges Polyacrylamidgel ($20 \times 20 \times 0,1 \text{ cm}^3$) aufgetragen werden können. Als Gel- und Laufpuffer wird 0,5fach TTE verwendet. Zur Visualisierung der Lauffront und des proteinfreien Substrats wird eine Probe ohne Enzymzugabe vorbereitet, mit PAGE-Auftragspuffer versetzt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Vor dem Probenauftrag wird das Gel einem 30minütigen Vorlauf bei konstant 20 mA unterzogen. Die elektrophoretische Trennung der Proben erfolgt ebenfalls bei 20 mA, bei *Shifts* mit dem Oligonukleotid so lange, bis der Farbstoff Azorubin des Standards ca. 2 cm vom unteren Gelrand entfernt ist (etwa 2 h), bzw. bei *Shifts* mit den PCR-Produkten bis der Farbstoff aus dem Gel gelaufen ist (etwa 2,5 h). Das Gel wird anschließend auf *Blot*papier (GB003, Schleicher & Schuell) unter Vakuum getrocknet.

Die Quantifizierung der entsprechenden Banden des freien bzw. gebundenen Substrats erfolgt wie bei den Spaltuntersuchungen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (siehe 2.5.7) mit dem Phosphoimager BAS 1000 bio imager und dem Auswerteprogramm MacBAS 2.4 der Firma Fuji. Aus den so erhaltenen Daten kann mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 97 unter Berücksichtigung der folgenden Formel (3) die Bindungskonstante K_{ass} berechnet werden.

$$K_{\text{ass}} = \frac{F}{(E_0 - F \cdot O_0)(1 - F)} \quad (3)$$

mit: F Anteil der gebundenen DNA
 E_0 Gesamtkonzentration des Enzyms
 O_0 Gesamtkonzentration des Oligonukleotids

Bindungspuffer:	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	50 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
TTE: (20fach)	1,8 M	Tris
	575 mM	Taurin
	2,7 mM	EDTA

PAGE-Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin
(2fach) 0,2 % (w/v) Azorubin
in 1fach TTE

2.5.9 Entwicklung eines Plasmid-Testsystems zur Untersuchung der Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz

Für die Untersuchung der Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz soll ein Plasmid mit zwei *EcoRI*-Spaltstellen generiert werden, die sich in den Seitensequenzen derart voneinander unterscheiden, daß bei der Methylierung dieses Plasmids mit einer CpG-Methylase nur eine der beiden Spaltstellen am Cytosin methyliert wird. Bei der Spaltung dieses methylierten Plasmids mit *EcoRI*-Enzymen ist so der direkte Vergleich zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz möglich. Eine eventuell auftretende Präferenz für eine der beiden Spaltstellen kann sofort ermittelt werden.

Als Ausgangsvektor für das zu generierende Plasmid wird pBR322 gewählt. Es besitzt bereits eine *EcoRI*-Spaltstelle mit den Seitensequenzen **CTTCAAGAATTCTCATGT**.

In diesen Vektor wird die zweite *EcoRI*-Spaltstellen mit den Seitensequenzen **GTCCACGAATTCGATCCG** insertiert. Die beiden Spaltstellen müssen in einem genügend großen Abstand voneinander entfernt liegen, damit bei der Spaltung Fragmente entstehen, die sich in einem Agarosegel gut trennen lassen. Bei der Methylierung des Plasmids durch eine CpG-Methylase wird nur die zweite *EcoRI*-Erkennungssequenz modifiziert und ist dann sozusagen von 5-Methylcytosinen flankiert.

Vor den kinetischen Untersuchungen muß das Plasmid zusätzlich mit einem entsprechenden Restriktionsenzym an geeigneter Position linearisiert werden, um zu entscheiden, welche der beiden Erkennungssequenzen gespalten wird.

Im folgenden sind die Darstellung, Modifizierung und Anwendung des Plasmid-Substrats pBR2Eco beschrieben.

2.5.9.1 Darstellung des Substrats pBR2Eco

Zur Generierung des Plasmids pBR2Eco wird zunächst das Plasmid pBR322 mit einem Restriktionsenzym, welches glatte Enden erzeugt, im Tetracyclinresistenzgen aufgeschnitten. Anschließend wird ein hybridisiertes, phosphoryliertes Oligonukleotid, das eine *EcoRI*-Spaltstelle trägt, zwischen die Enden kloniert. Durch die Insertion ist die Tetracyclinresistenz

deletiert, so daß die entstandenen Klone über die Selektionsmarker Ampicillin und Tetracyclin selektiert werden können.

Für die Herstellung des Rahmens bzw. linearisierten Vektors wird das Plasmid pBR322 mit dem Restriktionsenzym *NruI* präparativ gespalten (siehe 2.3.2) und nach elektrophoretischer Trennung (siehe 2.3.6.1) aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.3.1).

Das zu klonierende Oligonukleotidpaar „EcoRI_{meth}“ (siehe Tabelle 2.5), das ebenfalls in Spaltuntersuchungen Anwendung findet (siehe 2.5.7), wird zunächst in einem Ansatz phosphoryliert (siehe auch 2.3.4). Hierfür werden jeweils 3 pmol Oligonukleotid mit 1 mM ATP, 2 U PNK (MBI Fermentas) und 20 mM DTT im mitgelieferten Reaktionspuffer A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die nachfolgende Hybridisierung der phosphorylierten Oligonukleotide wird in Hybridisierungspuffer (siehe 2.3.7.1) durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließendes Abkühlen auf RT durchgeführt.

Für die *Blunt end*-Ligation (siehe 2.3.3) werden etwa 100 ng Rahmen mit dem hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotid äquimolar zusammengegeben und 5 h bei 17 °C inkubiert. Mit dem Reaktionsansatz werden Zellen des *E. coli*-Stamms LK111(λ) transformiert (siehe 2.2.5) und auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien werden zur weiteren Selektion auf LB_{Tet}-Agarplatten überimpft. Die auf diesen Platten nicht wachsenden Klone sind potentiell positiv und können das gewünschte Plasmid mit der Insertion enthalten.

Aus diesen Klonen werden die Plasmide isoliert und auf die insertierte *EcoRI*-Spaltstelle hin untersucht (siehe 2.3.2). Daraus hervorgehende positive Klone werden durch Sequenzierung (siehe 2.3.9) verifiziert.

2.5.9.2 Modifikation des Substrats pBR2Eco

Die Linearisierung und Methylierung des Plasmids pBR2Eco erfolgt parallel in einem Ansatz. Hierfür werden 5-10 μ g Plasmid-DNA mit 5 U des Restriktionsenzym *AlwNI* (NEB) und 8 U der CpG-Methylase *M.SssI* (NEB) im Reaktionspuffer 2 der Firma NEB zusammengegeben, 16 nmol S-Adenosylmethionin hinzugefügt und etwa 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die DNA mittels *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aus dem Ansatz isoliert und die Konzentration durch Messung eines UV-Spektrums (siehe 2.3.5) bestimmt.

2.5.9.3 Anwendung des Plasmid-Testsystems

Bevor die Spaltuntersuchungen zur Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz mit den *EcoRI*-Enzymen durchgeführt werden, muß das methylierte Plasmid auf den Grad der Methylierung und die Vollständigkeit der Linearisierung hin untersucht werden. Die Überprüfung der Methylierung erfolgt mit einem entsprechenden Restriktionsenzym, welches sensitiv gegenüber CpG-Methylierung ist und seine methylierte Erkennungssequenz nicht mehr spaltet. In der nachfolgenden Agarosegel-Elektrophorese kann zusätzlich die Vollständigkeit der zuvor mit *AlwNI* durchgeführten Linearisierung (siehe 2.5.9.2) überprüft werden. Bei vollständiger Methylierung und Linearisierung des Plasmids werden Spaltuntersuchungen mit den *EcoRI*-Mutanten und dem Wildtypenzym durchgeführt.

Überprüfung der Methylierung

Etwa 50 fmol methylierte Plasmid-DNA werden nach der unter 2.3.2 beschriebenen Methode analytisch mit dem Restriktionsenzym *Psp1406I*, für das sich auf dem Plasmid pBR2Eco vier Spaltstellen befinden, gespalten. Die Proben werden anschließend auf einem 1,0 %igen Agarosegel überprüft (siehe 2.3.6.1).

Die Methylierung ist erfolgreich durchgeführt worden, wenn auf dem Gel nur die linearisierte Bande des Plasmids und keine Spaltfragmente zu sehen sind.

Anwendung des Plasmid-Testsystems

80 fmol Plasmid-DNA pro Zeitwert werden mit einer definierten Menge an Enzym im einfachkonzentrierten Standard-Spaltpuffer (siehe 2.5.5) bei 37 °C inkubiert. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µL Agaroseauftragspuffer (siehe 2.5.5) gestoppt. Bei kinetischen Untersuchungen wird nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit ein Aliquot entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 µL Agaroseauftragspuffer (siehe 2.5.5) gestoppt. Die Analyse der Proben erfolgt auf einem 1,1-1,2 %igen Agarosegel (siehe 2.3.6.1).

Enzymverdünnungen werden mit 20 mM Tris/HCl des entsprechenden pH-Werts hergestellt. Abweichende Reaktionsbedingungen werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

3 Ergebnisse

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI* durch gezielte Aminosäureaustausche. Sie basiert auf Arbeiten von Küster (1998), der Untersuchungen hydrophober Kontakte der *EcoRI* zu ihrer spezifischen Erkennungssequenz durchführte. Aufgrund seiner Ergebnisse zu Mutationen der Aminosäure Met137, welche einen Kontakt über van der Waals-Bindung zum Cytosin der Erkennungssequenz herstellt, wurde der Kontakt zum gesamten GC-Basenpaar näher untersucht.

Hierfür wurden zunächst an der Position 137 vier weitere noch nicht charakterisierte Einzelmutanten M137C/K/L/N hergestellt und untersucht (siehe auch Kapitel 3.4.1). Eine Vielzahl anderer Austausche sind bei Küster (1998) beschrieben.

Ein Ansatz zur Veränderung der Sequenzspezifität baut auf Ergebnissen zu der Einzelmutante M137Q auf. Diese Mutante sei nach Küster (1998) sehr gut geeignet als Ausgangspunkt in Mehrfachmutanten, da sie sowohl potentiell in der Lage ist, einen Kontakt zu einem Thymin an der C-Position der Erkennungssequenz zu bilden, als auch eine Bevorzugung von 5-Methylcytosin an dieser Position zeigte. Um in diesem Kontext eine Änderung der Spezifität zu erreichen, liegt es nahe, alle weiteren Kontakte zu dem GC-Basenpaar der Erkennungssequenz zu verändern oder aufzuheben. Dafür kommen die Aminosäuren an den Positionen 200 und 203 in Frage. Es handelt sich dabei um Arginine, die das Guanin indirekt über ein zwischengelagertes Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen kontaktieren. Aufgrund des großen Abstands der Aminosäuren zur DNA kommt hier nur der Austausch gegen ebenfalls große Aminosäuren, wie zum Beispiel Lysin oder Tyrosin, in Frage. Daher wurden Mehrfachmutanten mit sämtlichen Kombinationen der Mutationen M137Q, R200K, R200Y und R203K hergestellt. Zur Vervollständigung der Charakterisierung und Ergebnisse wurden ebenfalls die jeweiligen Einzelmutanten von Arg200 und Arg203 generiert (siehe auch Kapitel 3.4.2 und 3.4.3).

In einem weiteren Ansatz zur Veränderung der Sequenzspezifität wird die Homologie zwischen den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *MunI* zugrundegelegt. Die Enzyme erkennen sehr ähnliche Sequenzen (GAATTC bzw. CAATTG) und ihre Aminosäuresequenzen weisen in Teilbereichen eine Übereinstimmung von 75 bis 100 % auf [Siksnys *et al.*, 1994]. Dabei ist ein sehr interessanter Aspekt, daß für die Erkennung der zentralen AATT-Sequenz vergleichbare Strukturelemente benutzt werden. In *EcoRI* sind daran Aminosäuren des *Extended chain*-Motivs (Gly140, Asn141 und Ala142) beteiligt. Von den übrigen drei *Extended chain*-Aminosäuren Met137, Ala138 und Ala139 sind die ersten

beiden ebenfalls in der Basenerkennung involviert. Das Alanin an der Position 139 entspricht in *MunI* dem Arg115, welches für die CG-Basenerkennung verantwortlich ist [Deibert *et al.*, 1999]. Durch Ersetzen dieser drei Aminosäuren Met137, Ala138 und Ala139 durch die in *MunI* vorhandenen entsprechenden Aminosäuren Alanin, Glycin und Arginin (Position 113 bis 115) sollte die Erkennung des äußeren Basenpaares beeinträchtigt und die Möglichkeit zur Spezifitätsveränderung erhöht werden. Daher wurde die Dreifachmutante M137A/A138G/A139R alleine und in Kombination mit R200K bzw. R203K generiert und biochemisch untersucht (siehe auch Kapitel 3.4.4).

3.1 Darstellung der *EcoRI*-Mutanten

Frühere Arbeiten zeigten, daß die Herstellung von Mutanten im Bereich der Aminosäureposition 200 durch *Gapped duplex*-Mutagenese große Schwierigkeiten bereitet, da Einzelstrang-DNA in diesem Bereich Sekundärstrukturen bilden kann [Geiger *et al.*, 1989-a]. Daher wurden die *EcoRI*-Mutanten R200K, R200Y, R203K, R200K/R203K und R200Y/R203K nicht mit dieser Methode hergestellt, sondern durch Kassettenmutagenese mit dem zuvor generierten Ausgangsplasmid pRIF309+(CH₆)*XhoI/SphI*. Dieses Ausgangsplasmid enthält zwei neu eingeführte Restriktionsspaltstellen für die Enzyme *XhoI* und *SphI* an den Aminosäurepositionen 192 und 210 im *ecoRI*-Gen. Es wurde mit der in Kapitel 2.3.7.1 beschriebenen *Gapped duplex*-Mutagenese durch gleichzeitiges Einsetzen von zwei Oligonukleotiden generiert. Die Aminosäuresequenz des *ecoRI*-Gens wurde dabei nicht verändert. Die verwendeten Mutageneseoligonukleotide sind in Tabelle 2.3 (siehe 2.3.7.4) aufgeführt.

Zwischen diese Restriktionsspaltstellen wurden die entsprechenden hybridisierten Oligonukleotide (siehe 2.3.7.2 und 2.3.7.4) mit den gewünschten Mutationen ligiert. Abbildung 3.1 zeigt die schematische Darstellung dieser Mutanten am Beispiel der Einzelmutante R200K.

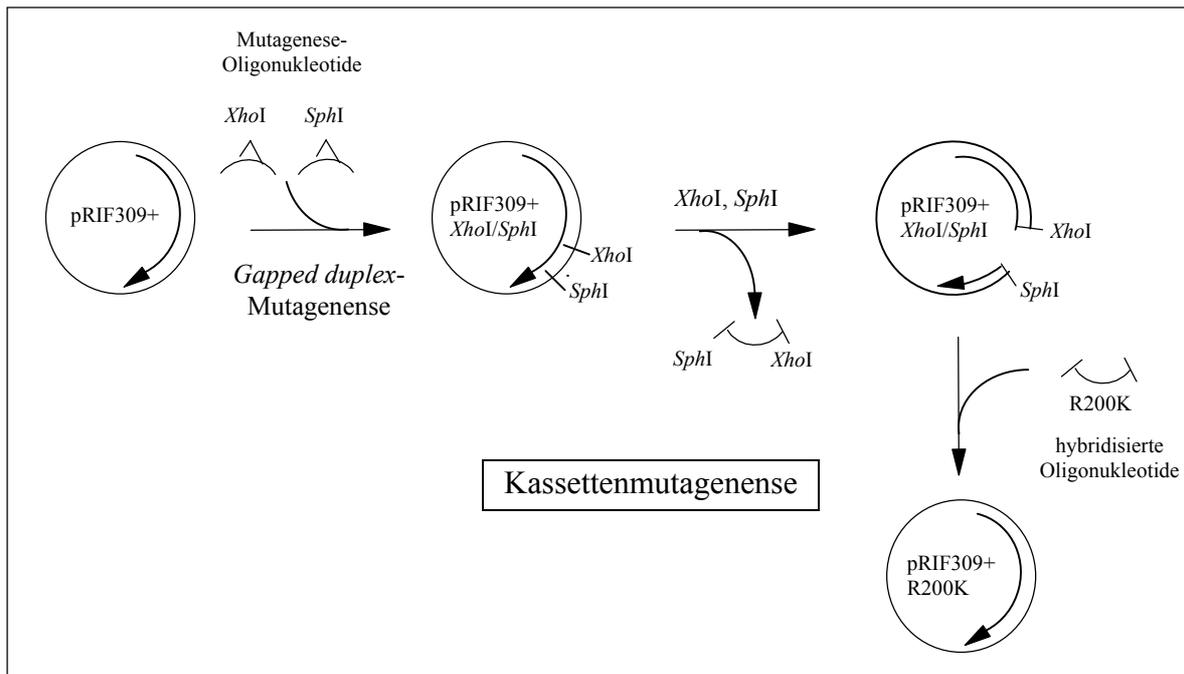


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Erzeugung der Mutante R200K

Im Anschluß an die Darstellung der oben beschriebenen Mutanten folgte die Generierung der Mutanten M137Q/R200K, M137Q/R200Y, M137Q/R203K, M137Q/R200K/R203K und M137Q/R200Y/R203K durch Zusammenklonierung eines DNA-Fragments (Rahmen) der entsprechenden Plasmide mit dem *Insert* des Plasmids pRIF309+(CH₆)M137Q, welches das Gen für die bereits hergestellte und charakterisierte Mutante M137Q [Küster, 1998] enthält. Es wurde mit einer zusätzlichen Restriktionsspaltsstelle neu kloniert, da bei der ersten Herstellung die *Bgl*II-Spaltsstelle als stille Mutation zerstört wurde, die für das Zusammenklonieren unabdingbar ist. Es wurde wie das erste Ausgangsplasmid durch die in Kapitel 2.3.7.1 beschriebene *Gapped duplex*-Mutagenese unter Verwendung des in Tabelle 2.3 (siehe 2.3.7.4) angegebenen Mutageneseoligonukleotids generiert.

Für die Spaltung der Plasmide wurden die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Bgl*II verwendet (siehe 2.3.7.3). Abbildung 3.2 zeigt die schematische Darstellung dieser Mutanten am Beispiel der Mutante M137Q/R200K.

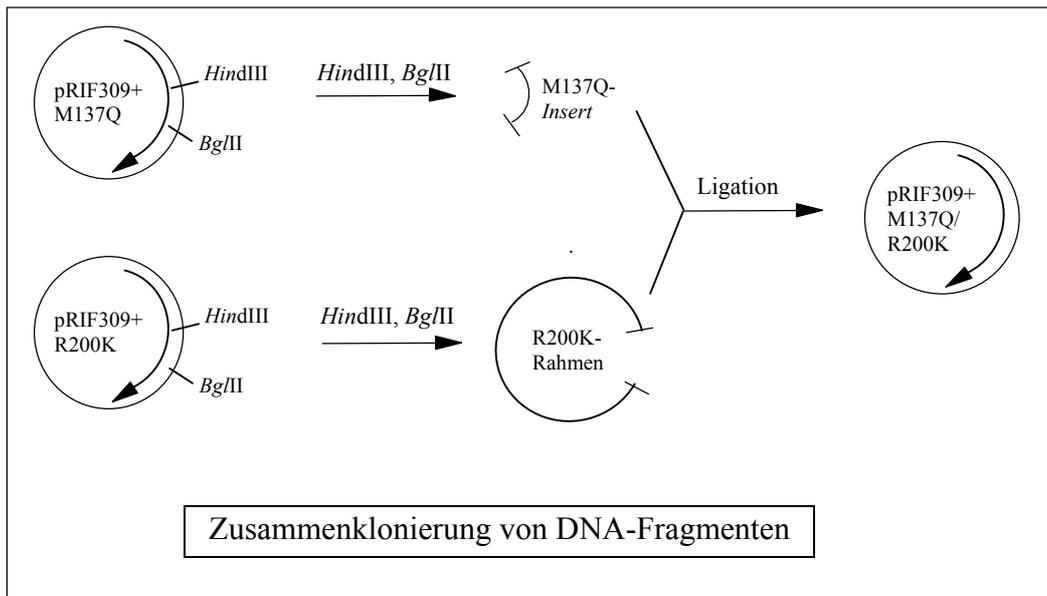


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Klonierung der Mutante M137Q/R200K

Für die Herstellung der Einzelmutanten M137C, M137K, M137L, M137N, sowie der Mehrfachmutanten M137A/A138G/A139R und M137A/A138G/A139R/R200K wurden ebenfalls zunächst zwei Ausgangsplasmide generiert, zum einen das Plasmid pRIF309+(CH₆)*Eco91I/XhoI/SphI*, das für die Klonierung der ersten fünf angegebenen Mutanten verwendet wurde (siehe Abbildung 3.3). Es unterscheidet sich von dem oben genannten Ausgangsvektor nur dadurch, daß es eine zusätzliche Spaltstelle für *Eco91I* an der Aminosäureposition 132 im *ecoRI*-Gen enthält. Auf dem zweiten Ausgangsplasmid befindet sich neben den drei zusätzlichen Spaltstellen (*Eco91I*, *XhoI* und *SphI*) die Aminosäuremutation R200K (pRIF309+(CH₆)R200K/*Eco91I/XhoI/SphI*). Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich wurden die zwei zuletzt angegebenen Ausgangsplasmide durch Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten hergestellt (siehe 2.3.7.3). Dafür wurden als Rahmen die mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BglIII* aufgeschnittenen Plasmide pRIF309+(CH₆)R200K und pRIF309+(CH₆)*XhoI/SphI* verwendet. Als *Insert* diente ein DNA-Fragment aus dem von Frau von Witzendorff hergestellten Plasmid pRISrep*EcoRI*133 (*Eco91I*) [von Witzendorff, 2002], welches die Schnittstelle für *Eco91I* trägt. Das zweite Ausgangsplasmid pRIF309+(CH₆)R200K/*Eco91I/XhoI/SphI* wurde einzig zur Klonierung der oben genannten Vierfachmutante verwendet, was durch Ligation des hybridisierten Oligonukleotidpaars „M137A/A138G/A139R“ zwischen die Spaltstellen für *Eco91I* und *BglIII* erfolgte (siehe 2.3.7.2 und 2.3.7.4). Auf gleiche Weise wurden die anderen fünf Mutanten kloniert, wobei die entsprechenden hybridisierten Oligonukleotidpaare und der Vektor pRIF309+(CH₆)*Eco91I/XhoI/SphI* verwendet wurden. Abbildung 3.3 zeigt die

schematische Darstellung dieser Mutanten am Beispiel der Mutante M137C. Die Herstellung des Ausgangsvektors pRIF309+(CH₆)Eco911/XhoI/SphI ist ebenfalls angegeben.

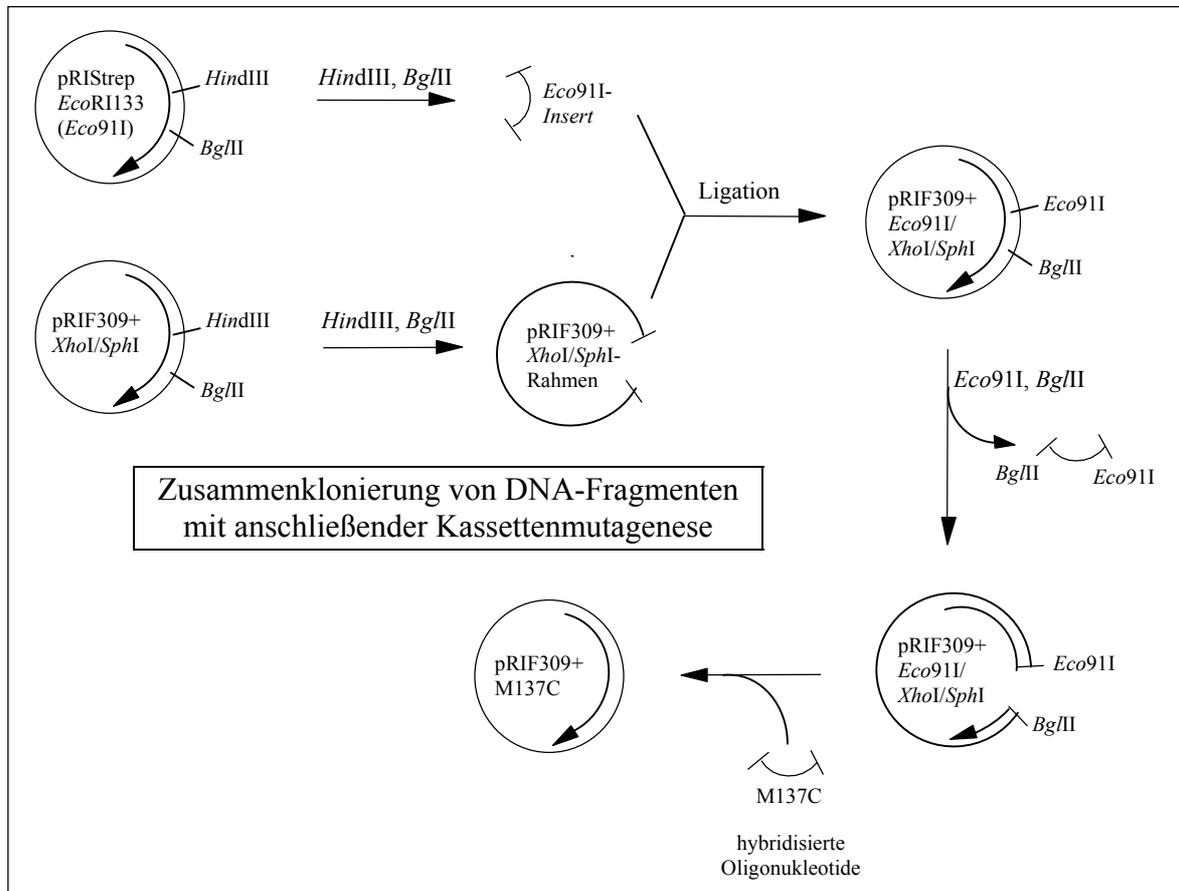


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Klonierung der Mutante M137C mit vorangestellter Generierung des Ausgangsplasmids pRIF309+(CH₆)Eco911/XhoI/SphI

Die Herstellung der zweiten Vierfachmutante M137A/A138G/A139R/R203K verlief analog der Klonierung der Mutante M137Q/R203K (siehe Abbildung 3.2). Das Zusammenklonieren erfolgte hierbei mit Rahmen-DNA des Plasmids pRIF309+(CH₆)R203K und *Insert*-DNA des Plasmids pRIF309+(CH₆)M137A/A138G/A139R, welche die Dreifachmutation trägt (siehe 2.3.7.3). Für die Spaltung der Plasmide wurden die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Bgl*II verwendet.

In Tabelle 3.1 sind die vier Ausgangsvektoren für die Herstellung der *Eco*RI-Mutanten mit Angabe ihrer Herstellungsmethode zur Übersicht aufgelistet.

Tab. 3.1: Liste der Ausgangsvektoren für die Klonierung der *EcoRI*-Mutanten mit Angabe ihrer Herstellung

Ausgangsvektor	Herstellungsmethode
pRIF309+(CH ₆) <i>XhoI/SphI</i>	<i>Gapped duplex</i> -Mutagenese
pRIF309+(CH ₆)M137Q	<i>Gapped duplex</i> -Mutagenese
pRIF309+(CH ₆) <i>Eco91I/XhoI/SphI</i>	Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten (pRIF309+(CH ₆) <i>XhoI/SphI</i> + <i>Eco91I-Insert</i>)
pRIF309+(CH ₆)R200K/ <i>Eco91I/XhoI/SphI</i>	Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten (pRIF309+(CH ₆)R200K/ <i>XhoI/SphI</i> + <i>Eco91I-Insert</i>)

Zur besseren Übersicht ist in Tabelle 3.2 eine Zusammenfassung der Darstellung der einzelnen *EcoRI*-Mutanten mit Angabe der Herstellungsmethode, Ausgangsvektoren und für die Klonierung verwendeten Spaltstellen erstellt.

Tab. 3.2: Methoden und Vektoren zur Herstellung der *EcoRI*-Mutanten

Methode	Ausgangsvektor	Spaltstellen	<i>EcoRI</i> -Mutante
Klonierung von hybridisierten Oligonukleotiden	• pRIF309+(CH ₆) <i>XhoI/SphI</i>	<i>XhoI, SphI</i>	R200K R203K R200K/R203K R200Y R200Y/R203K
	• pRIF309+(CH ₆) <i>Eco91I/XhoI/SphI</i>	<i>Eco91I, BglII</i>	M137C M137K M137L M137N M137A/A138G/A139R
	• pRIF309+(CH ₆)R200K/ <i>Eco91I/XhoI/SphI</i>	<i>Eco91I, BglII</i>	M137A/A138G/A139R/ R200K

Methode	Ausgangsvektor	Spaltstellen	<i>EcoRI</i> -Mutante
Zusammenklonierung von DNA-Fragmenten	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R200K • pRIF309+(CH₆)M137Q 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137Q/R200K
	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R203K • pRIF309+(CH₆)M137Q 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137Q/R203K
	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R200K/R203K • pRIF309+(CH₆)M137Q 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137Q/R200K/R203K
	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R200Y • pRIF309+(CH₆)M137Q 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137Q/R200Y
	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R200Y/R203K • pRIF309+(CH₆)M137Q 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137Q/R200Y/R203K
	<ul style="list-style-type: none"> • pRIF309+(CH₆)R203K • pRIF309+(CH₆)M137A/A138G/A139R 	<i>HindIII, BglIII</i>	M137A/A138G/A139R/ R203K

Im Anschluß an die jeweilige Klonierung wurden alle erzeugten *EcoRI*-Mutanten und Ausgangsvektoren durch Sequenzierung (siehe 2.3.9) des gesamten *ecoRI*-Gens verifiziert.

3.2 Aufreinigung der *EcoRI*-Mutanten

Zunächst wurden Zellen des *E. coli*-Expressionsstamms TGE900(pEcoR4) (siehe 2.2.1) mit den hergestellten sequenzpositiven Plasmiden der jeweiligen *EcoRI*-Mutanten transformiert und einem Expressionstest zur Überprüfung der Expression des mutierten Genprodukts unterzogen (siehe 2.2.7). Bei einem positiven Testergebnis wurden die entsprechenden Zellen in einer Fermentation im 10 L-Maßstab (siehe 2.4.1) zur Überexpression des *EcoRI*-Proteins eingesetzt. Nach Aufschluß der Zellen per Ultraschall (siehe 2.4.2) erfolgte die Aufreinigung der Proteine, die alle einen am C-Terminus fusionierten Hexahistidintag besitzen, über Affinitäts- und anschließende Ionenaustauschchromatographie wie in dem Kapitel 2.4.3 beschrieben. Dabei wurde bei der Aufreinigung der Mutanten M137K, M137L, M137N und M137Q über die Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule ein Stufengradient zur Elution verwendet (siehe

2.4.3.1). Die Elution aller übrigen Mutanten erfolgte durch einen linearen Gradienten (siehe 2.4.3.1). In den Abbildungen 3.4 und 3.5 ist exemplarisch das jeweilige Elutionsverhalten für die Aufreinigung über einen Stufengradienten bzw. einen linearen Gradienten gezeigt.

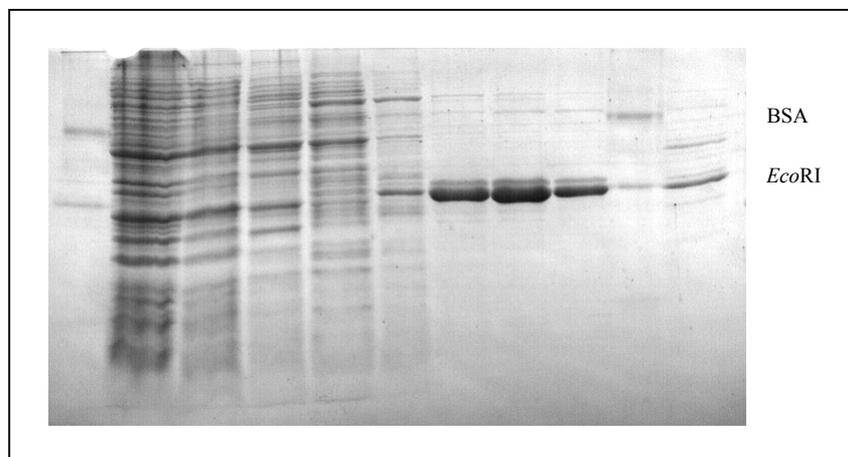


Abb. 3.4: Aufreinigung der *EcoRI*-Mutante M137N durch Affinitätschromatographie mit Stufengradient (Auftrag v. l. n. r.: Standard *EcoRI*/BSA, Durchlauf, Waschfraktionen 1 und 2, Eluatfraktionen 1 bis 5, Standard *EcoRI*/BSA, Säulenmaterial)

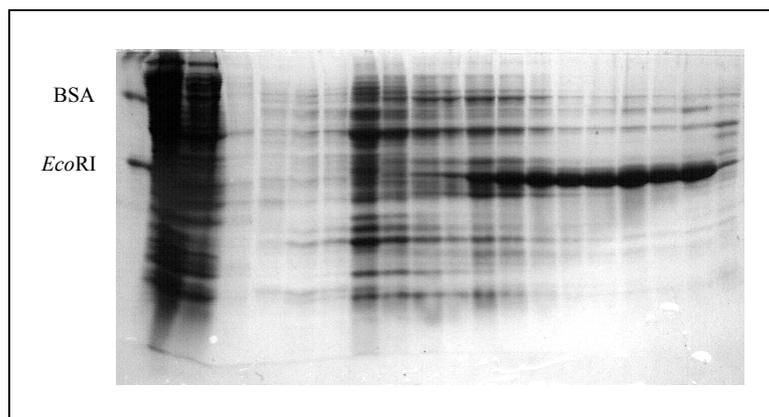


Abb. 3.5: Aufreinigung der *EcoRI*-Mutante M137Q/R200K durch Affinitätschromatographie mit linearem Gradienten (Auftrag v. l. n. r.: Standard *EcoRI*/BSA, Zelllysat, Durchlauf, Waschfraktionen 1 und 2, Eluatfraktionen 2 bis 26 (jede zweite), Zusatzeluat, Säulenmaterial)

Die *EcoRI*-haltigen Fraktionen aus der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurden vereinigt und über eine Ionenaustauschersäule aus Phosphocellulose weiter aufgereinigt (siehe 2.4.3.2). Die Elution des Proteins erfolgte über einen Stufengradienten mit steigender NaCl-Konzentration, wobei der Hauptanteil Protein bei der Mehrzahl der Mutanten in einem Konzentrationsbereich von 1,00-1,66 M NaCl von der Säule eluierte (siehe Abbildung 3.6).

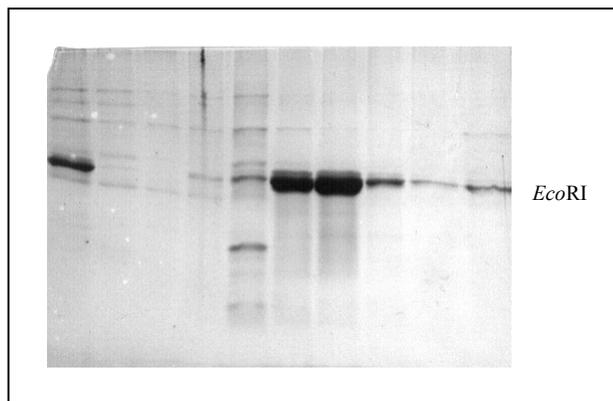


Abb. 3.6: Elutionsverhalten der *EcoRI*-Mutante M137Q/R200K von der Ionenaustauschersäule (Auftrag v. l. n. r.: vereinigte Eluatfraktionen aus der Affinitätschromatographie, Durchlauf, Waschfraktion, Eluatfraktionen 1 bis 6, Säulenmaterial)

Bei der Aufreinigung der Mutanten R200Y, R200Y/R203K, M137Q/R200Y und M137Q/R200Y/R203K blieb trotz Elution mit 2 M NaCl sehr viel Protein auf der Phosphocellulose-Säule gebunden, wodurch nur eine geringe Ausbeute bzw. Konzentration erzielt werden konnte (siehe Tabelle 3.3). Die Elution mit einer höheren NaCl-Konzentration als 2 M ist in solch einem Fall nicht zu empfehlen, da die Gefahr besteht, bereits ausgefallenes und dadurch inaktiviertes Protein wieder in Lösung zu bringen.

Im Anschluß an die Ionenaustauschersäule wurden die *EcoRI*-haltigen Fraktionen gegen glycerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.4).

In Tabelle 3.3 sind Konzentration und Reinheit der Proteinpräparationen der einzelnen *EcoRI*-Mutanten angegeben. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben über die Aufnahme eines UV-Spektrums. Die Reinheit der Proteine wurde über Färbung mit Coomassie auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) beurteilt, wobei nahezu alle Präparationen eine Sauberkeit von mehr als 95 % aufwiesen.

Tab. 3.3: Konzentration und Reinheit der Proteinpräparationen der *EcoRI*-Mutanten

Mutante	Konzentration [μ M]	Reinheit [%]
M137C	2,7	\approx 90
M137K	3,8	>95
M137L	15,8	>95
M137N	13,9	>95
M137Q	23,0	>95
R200K	20,5	>95

Mutante	Konzentration [μ M]	Reinheit [%]
R203K	15,7	>95
R200K/R203K	2,2	>95
M137Q/R200K	10,0	>95
M137Q/R203K	10,1	>95
M137Q/R200K/R203K	12,7	>95
R200Y	0,7	>95
M137Q/R200Y	1,2	>95
R200Y/R203K	1,5	>95
M137Q/R200Y/R203K	1,9	>95
M137A/A138G/A139R	3,6	>95
M137A/A138G/A139R/R200K	12,6	\approx 90
M137A/A138G/A139R/R203K	1,7	>95

Die Expressionseffizienz der Mutanten war unterschiedlich. Das machte sich schon während der Aufreinigung bemerkbar, da bei ähnlicher Masse an aus der Fermentation erhaltenen Bakterienzellen unterschiedliche Mengen an *EcoRI*-Protein auf dem analytischen Laemmli-Gel zu sehen waren, und führt dann zu unterschiedlichen Endkonzentrationen der Proteinpräparationen.

Die enthaltenen Proteine konnten in einem *Western blot* (siehe 2.5.3) mit einem polyklonalen Antikörper als *EcoRI* nachgewiesen werden [Fritz, 1994].

3.3 CD-Spektren

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurden CD-Spektren der aufgereinigten *EcoRI*-Mutanten wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben aufgenommen. Aus den Spektren ergaben sich durch Auswertung mit dem Programm CDPro [Sreerama & Woody, 2000] die in Tabelle 3.4 angegebenen Werte für die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt bzw. *Turn* der einzelnen Proteine im Vergleich zum Wildtypenzym.

Tab. 3.4: Sekundärstrukturanteile der *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum wt-*EcoRI*

Enzym	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	<i>Turn</i> [%]
wt- <i>EcoRI</i>	36	16	15
M137C	36	19	17
M137K	42	16	16
M137L	35	12	17
M137N	36	11	17
M137Q	33	13	17
R200K	36	13	18
R203K	38	11	17
R200K/R203K	40	15	17
M137Q/R200K	29	14	17
M137Q/R203K	33	13	18
M137Q/R200K/R203K	32	15	18
R200Y	22	16	16
M137Q/R200Y	32	15	18
R200Y/R203K	31	14	18
M137Q/R200Y/R203K	32	14	18
M137A/A138G/A139R	36	13	15
M137A/A138G/A139R/R200K	35	11	16
M137A/A138G/A139R/R203K	33	12	17

Der Großteil der *EcoRI*-Mutanten zeigte im Vergleich zum Wildtypenzym keine signifikanten Unterschiede, weder in den Sekundärstrukturanteilen noch in der Spektrenform.

Einzig die Mutante R200Y zeigte mit einem α -Helix-Anteil von nur 22 % eine große Abweichung vom Wildtypenzym. Dieser niedrige Wert spricht dafür, daß das Protein in seiner Struktur beeinträchtigt ist. Die Verminderung dieses Strukturanteils geht einher mit dem Sachverhalt, daß die Aminosäure Arg200 am Ende einer Helix im Protein lokalisiert ist.

Die drei Mehrfachmutanten, die die Mutation R200Y enthalten, zeigten im Vergleich zum Wildtypenzym nur eine leichte Reduzierung des α -Helix-Strukturanteils. Hier wird anscheinend der Einfluß der Einzelmutation R200Y durch die zusätzlichen Mutationen M137Q bzw. R203K gemildert, so daß sich Werte ergeben, die noch im Rahmen der üblichen Abweichungen liegen und keine Strukturveränderungen mit sich führen.

3.4 Kinetische Charakterisierung der *EcoRI*-Mutanten

Zur Überprüfung der biochemischen Eigenschaften der *EcoRI*-Mutanten in Hinblick auf katalytische Aktivität und Sequenzspezifität im Vergleich zu dem Wildtypenzym wurden kinetische Untersuchungen und Spaltexperimente mit unterschiedlichen Substraten unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt.

Zunächst erfolgten für jede Mutante Kinetiken mit dem Standardsubstrat λ -DNA zur Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität (siehe 2.5.5). Dabei ist eine Enzymeinheit als die Proteinmenge definiert, die 1 μ g λ -DNA in einer Stunde bei 37 °C unter Standardpufferbedingungen vollständig an allen fünf GAATTC-Sequenzen spaltet. Abbildung 3.7 zeigt die Positionen der fünf Spaltstellen A bis E auf dem linearen Substrat mit Angabe der Größen der entstehenden Fragmente.

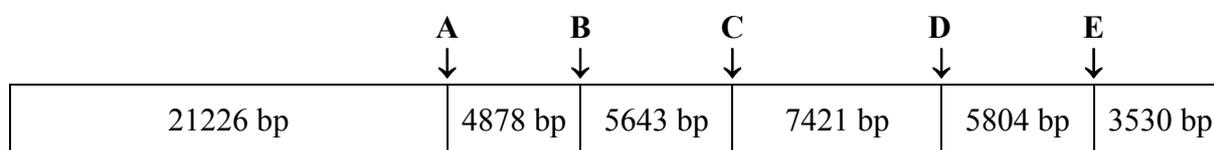


Abb. 3.7: Spaltstellen von *EcoRI* auf λ -DNA mit Angabe der Spaltfragmentgrößen

Zur weiteren Charakterisierung einzelner Mutanten wurden Spaltuntersuchungen mit verschiedenen Plasmiden (pBR322, pRIF309+, pUC8) durchgeführt, wobei allerdings keine quantitative Auswertung erfolgte, sondern nur die Qualität der Spaltung betrachtet wurde (siehe 2.5.6).

Eine dritte Charakterisierungsmethode ist die Spaltung von Oligonukleotiden. Hierbei fand standardmäßig für alle *EcoRI*-Mutanten das Oligonukleotidpaar B/C Anwendung (siehe 2.5.7).

EcoRI besitzt eine sehr hohe Spezifität für ihre Erkennungssequenz, so daß unter Standardbedingungen sogenannte *Star*sequenzen, die in einem Basenpaar von der Erkennungssequenz abweichen, mit bis zu 10^6 -fach geringerer Geschwindigkeit gespalten werden als die spezifische Sequenz. Sequenzen, die sich in mehr als einem Basenpaar unterscheiden, werden

gar nicht mehr gespalten [Gardner *et al.*, 1982]. Reduziert werden kann die Genauigkeit des Enzyms durch Veränderung der Pufferbedingungen (*Starbedingungen*), zum Beispiel durch Austausch der Mg^{2+} -Ionen gegen Mn^{2+} -Ionen [Hsu & Berg, 1978; Woodhead *et al.*, 1981], Zugabe organischer Lösungsmittel [Goodman *et al.*, 1977; Malyguine *et al.*, 1980] oder Erniedrigung der Ionenstärke bei gleichzeitiger Erhöhung des pH-Werts auf über 8,0 [Polisky *et al.*, 1975]. Dabei führen diese *Starbedingungen* neben einer Verringerung der Spaltgeschwindigkeit der kanonischen Spaltstellen um den Faktor 10 bis 100 gleichzeitig zu einer Erhöhung der Spaltung der *Starsequenzen* [Woodbury *et al.*, 1980]. Eine *Starspaltung* unter Standardbedingungen kann auftreten, wenn die eingesetzte Enzymkonzentration hoch genug ist [Pingoud, 1985]. Untersuchungen an unter Standardbedingungen inaktiven *EcoRI*-Mutanten, wie zum Beispiel die Mutanten Q115A [Jeltsch *et al.*, 1993-a], N141A und N141D [Fritz *et al.*, 1998], zeigten eine Steigerung der Spaltgeschwindigkeit auf der kanonischen Sequenz durch *Starbedingungen*, was mit der Beeinflussung der Kopplung zwischen DNA-Erkennung und Katalyse durch die Pufferbedingungen zusammenhängt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit alle *EcoRI*-Mutanten sowohl unter Standardbedingungen als auch unter den drei in Kapitel 2.5.5 angegebenen *Starbedingungen* untersucht.

Für die Darstellung der Ergebnisse zu den kinetischen Charakterisierungen sind die *EcoRI*-Mutanten in vier Gruppen gegliedert (siehe Kapitel 3.4.1 bis 3.4.4).

3.4.1 Einzelmutanten an der Position Met137

Eine Vielzahl von Einzelmutanten an der Position Met137 sind bei Küster (1998) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich dazu vier weitere Mutanten, nämlich M137C, M137K, M137L und M137N, hergestellt und untersucht. Das Methionin an dieser Position geht einen hydrophoben Kontakt zur Erkennungssequenz ein. Das geschieht mit dem Schwefel über van der Waals-Bindung zum H5 und H6 des Cytosins [Rosenberg, 1991]. Durch die gezielten Aminosäureaustausche sollen weitere Erkenntnisse über die hydrophoben Wechselwirkungen gewonnen werden.

Eine besondere Stellung nimmt die Mutante M137Q ein. Es ist die einzige Mutante des *Extended chain*-Motivs, die keinen Aktivitätsverlust gegenüber dem Wildtypenzym aufweist. Außerdem ist sie, wie bereits Anfang des dritten Kapitels erwähnt, potentiell in der Lage, einen Kontakt zu einem Thymin an der C-Position der Erkennungssequenz zu bilden. Sie kommt daher in Mehrfachmutanten zum Einsatz (siehe 3.4.2 und 3.4.3) und die Ergebnisse der vier neu erstellten Mutanten werden mit ihren Ergebnissen verglichen.

3.4.1.1 Spaltung von λ -DNA

Die spezifische Aktivität der Mutanten M137C, M137K, M137L und M137N wurde durch Spaltkinetiken bei 37 °C mit dem Substrat λ -DNA bestimmt. Dafür wurden jeweils verschiedene Enzymkonzentrationen und Zeitwerte getestet und so optimiert, daß eine Aktivitätsberechnung möglich war. In Tabelle 3.5 ist eine Übersicht über das Spaltverhalten der vier Mutanten unter den vier Pufferbedingungen (Standard, Mangan, Niedrigsalz pH 8,8 und Hochsalz pH 8,8; siehe 2.5.5) im Vergleich zum Wildtypenzym und zu der Mutante M137Q [Küster, 1998] angegeben.

Tab. 3.5: Spezifische Spaltaktivität der *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum wt-*EcoRI* und zur Mutante M137Q; ein Auftreten von *Starspaltung* im Anschluß an das kanonische Muster ist mit (*) gekennzeichnet; (– λ -B) bedeutet Angabe der Aktivität unter Vernachlässigung der Spaltstelle B

Enzym	Spezifische Spaltaktivität [U mg ⁻¹] unter Pufferbedingung			
	Standard	Mangan	Niedrigsalz pH 8,8	Hochsalz pH 8,8
wt- <i>EcoRI</i>	$1,8 \times 10^6$	<i>Starspaltung</i>	<i>Starspaltung</i>	$1,2 \times 10^6$
M137Q	$2,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$ (*)	$2,1 \times 10^6$
M137C	$6,0 \times 10^2$ (*)	$< 6,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^4$	Andeutung spez. Banden
M137K	$5,7 \times 10^2$ (– λ -B)	keine Spaltung	$3,2 \times 10^3$ (– λ -B)	keine Spaltung
M137L	$4,1 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$ (*)	$4,1 \times 10^3$ (*)
M137N	$1,7 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$ (*)	$1,7 \times 10^3$

Die vier Mutanten zeigten einen starken Verlust an katalytischer Aktivität, was in Hinblick auf die zuvor von Küster (1998) hergestellten und untersuchten Einzelmutanten an der Position Met137 zu erwarten war. Unter der *Star*bedingung mit Niedrigsalz bei einem pH-Wert von 8,8 war die Aktivität der vier Mutanten am größten, wobei die Mutanten M137L und M137N, genauso wie die M137Q, nach Auftreten des kanonischen Spaltmusters in *Starspaltung* übergingen. Die Leucin-Mutante zeigte dieses Verhalten auch unter Hochsalz-Bedingungen, allerdings weniger ausgeprägt bzw. langsamer als unter Niedrigsalz-Bedingungen. Bei der Mutante M137C trat *Starspaltung* nur unter Standardbedingungen bei einer Enzymkonzentration von 450nM auf, was in Hinblick auf die Ergebnisse von Pingoud (1985) wahrscheinlich durch die hohe Enzymkonzentration hervorgerufen wurde.

Eine Ausnahme in dieser Reihe von vier Mutanten bildete die Mutante M137K. Außer unter Niedrigsalz-Bedingungen konnte keine Spaltung, trotz einer Reaktionszeit von drei Stunden mit einer Enzymkonzentration von 63 nM, detektiert werden. Erst mit einer Enzymkonzentration von 633 nM unter Standardbedingungen mit der doppelten Menge an λ -DNA (500 ng pro Zeitwert) konnten schwache Banden neben einem Schmier von unspezifischer Nukleaseaktivität sichtbar gemacht werden. Die Spaltungen der λ -DNA, sowohl bei Niedrigsalz- als auch bei Standardbedingungen, zeichneten sich dadurch aus, daß die Spaltstelle B (siehe Abbildung 3.7) stark verlangsamt gespalten wurde. In Abbildung 3.8 ist die Spaltung unter Vernachlässigung der B-Spaltstelle dargestellt.

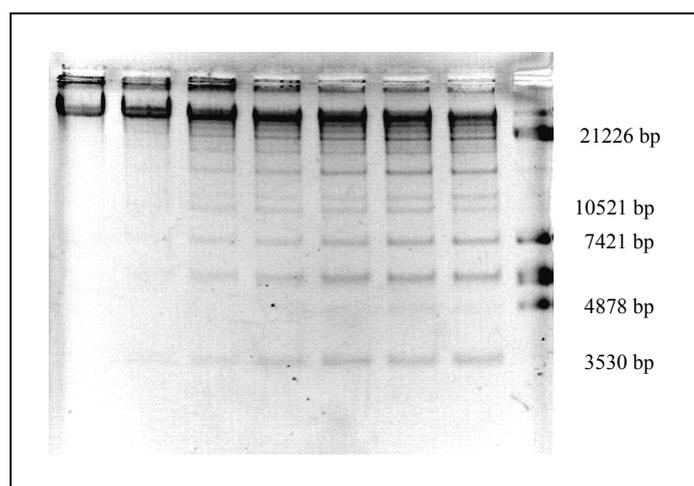


Abb. 3.8: Spaltkinetik der Mutante M137K (63 nM) mit λ -DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen (Auftrag v. l. n. r.: Zeitwerte 15, 30, 76, 90, 120, 150, 180 min, Standard-Spaltmuster *Eco*RI: 21226, 7421, 5804, 5643, 4878 und 3530 bp (hier nicht zu erkennen))

In dem von der Mutante M137K erzeugten Spaltmuster fehlen die beiden Fragmente der Größe 5643 und 4878 bp nahezu ganz. Diese zwei Fragmente werden durch Spaltung der λ -Spaltstelle B erzeugt (siehe Abbildung 3.7). Das ungespaltene Doppelfragment besitzt eine Größe von 10521 bp und ist oberhalb der 7421 bp großen Bande auf dem Gel zu sehen. Die anderen zusätzlich zum Standard-Spaltmuster vorhandenen Banden sind Zwischenfragmente der noch nicht vollständigen Spaltung.

Ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Spaltung der λ -B-Spaltstelle zeigten ebenfalls die bereits von Küster (1998) untersuchten Mutanten M137E, M137H und M137R. Sowohl bei diesen als auch bei der M137K handelt es sich um Mutanten mit Austausch zu Aminosäuren mit saurer (E) bzw. basischer (H, K, R) Seitenkette.

3.4.1.2 Spaltung von Plasmiden

Da die *EcoRI*-Mutanten M137L und M137N auf λ -DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen nach Auftreten des kanonischen Musters in *Starspaltung* übergangen und die Mutante M137K eine Vernachlässigung der λ -B-Spaltstelle zeigte, wurden zur weiteren Untersuchung der Spalteigenschaften Kinetiken mit den drei Plasmiden pBR322, pRIF309+ und pUC8 als Substrat durchgeführt (siehe 2.5.6).

pBR322 und pUC8 besitzen jeweils eine *EcoRI*-Spaltstelle, auf pRIF309+ befinden sich drei. Die Anzahl der *Starspaltstellen* beträgt elf für pBR322, vier für pUC8 und 23 für pRIF309+. Zum Vergleich der Art und Anzahl der gespaltenen Sequenzen wurden die Spaltungen unter Niedrigsalz-Bedingungen auch mit dem Wildtypenzym durchgeführt.

Die Mutante M137K wurde mit den Plasmiden pRIF309+ und pUC8 getestet. Dabei konnte lediglich festgestellt werden, daß alle kanonischen Spaltstellen bei genügend langer Inkubationszeit (über Nacht) gespalten wurden.

Die anderen beiden Mutanten wurden mit allen drei Plasmiden untersucht. Sie zeigten ab einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei einer Enzymkonzentration von etwa 250 nM nach vollständiger Spaltung der kanonischen Sequenzen *Starspaltung*. Es wurden allerdings weniger Stellen gespalten als vom Wildtypenzym. In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse für die Plasmide pBR322 und pUC8 im Vergleich zu den vom Wildtypenzym gespaltenen Sequenzen aufgelistet.

Tab. 3.6: Von den Mutanten M137L und M137N unter Niedrigsalz-Bedingungen gespaltene *Star*sequenzen der Plasmide pBR322 und pUC8 im Vergleich zum Wildtypenzym

Plasmid	von Enzym gespaltene <i>Star</i> sequenzen		
	<i>wt-EcoRI</i>	M137L	M137N
pBR322	TAATTC	TAATTC	TAATTC
	GAAGTC		
	GAGTTC		
	GAATGC		
pUC8	TAATTC	TAATTC	TAATTC
	GAGTTC		

Die Mutanten waren nur in der Lage, jeweils eine *Starspaltstelle* neben der kanonischen Sequenz zu spalten, was wahrscheinlich in ihrer verminderten katalytischen Aktivität begründet liegt.

Für das Plasmid pRIF309+ wurde keine Liste über die gespaltenen Sequenzen erstellt, da es zu viele *Starspaltstellen* enthält, so daß eine Auswertung sehr kompliziert und umfangreich wird. In Abbildung 3.9 ist die Vielzahl der von dem Wildtypenzym unter Niedrigsalz-Bedingungen geschnittenen Spaltstellen erkennbar.

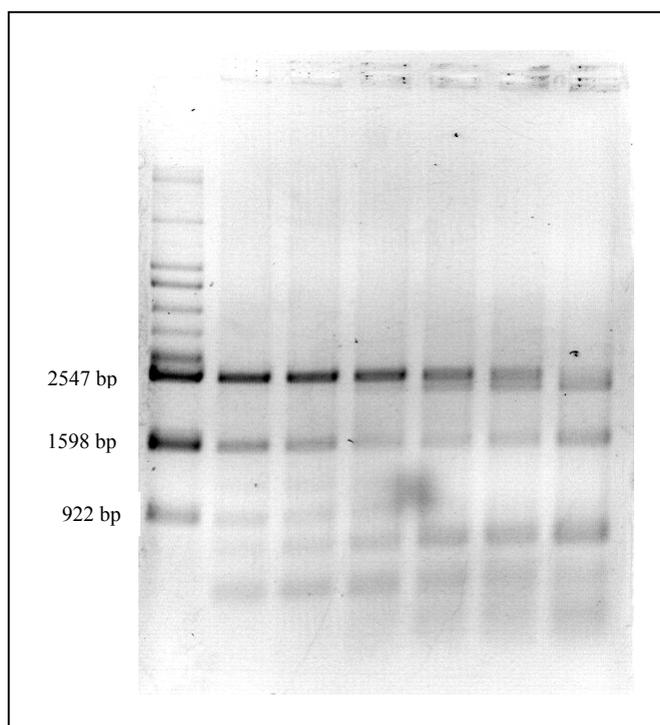


Abb. 3.9: Spaltung des Plasmids pRIF309+ mit wt-*EcoRI* unter Niedrigsalz-Bedingungen (Auftrag v. l. n. r.: Standard-Spaltmuster *EcoRI*: 2547, 1598 und 922 bp (oberhalb: Nebenbanden der nicht vollständigen Spaltung), Zeitwerte 5, 10, 20, 40, 60, 120 min)

Das Spaltverhalten der Mutante M137C mit Plasmiden wurde nicht untersucht, da sie mit λ -DNA keine Besonderheiten zeigte.

3.4.1.3 Spaltung von Oligonukleotiden

Als dritte Charakterisierungsmethode und zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} wurde die Spaltung des Oligonukleotidpaares B/C angewendet (siehe 2.5.7). Das Oligonukleotid ist 29 Basenpaare lang und enthält zentral eine *EcoRI*-Erkennungssequenz. Zur Spaltung wurden am 5'-Ende des B-Strangs radioaktiv markierte (siehe 2.5.7.1) Hybride

eingesetzt, so daß ein 12 Nukleotide langes Spaltprodukt erzeugt wird. Die Sequenzen der beiden komplementären Oligonukleotide sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Die Untersuchungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur. Enzymmenge und Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß aus dem kinetischen Reaktionsverlauf über die Anfangsumsatzgeschwindigkeit die Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden konnte. Dafür wurden die Kinetiken mit dem Phosphoimager BAS 1000 bio imager der Firma Fuji quantitativ ausgewertet und daraus mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 eine Umsatzkurve errechnet. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch den kinetischen Verlauf einer Spaltung des Oligonukleotidpaares B/C.

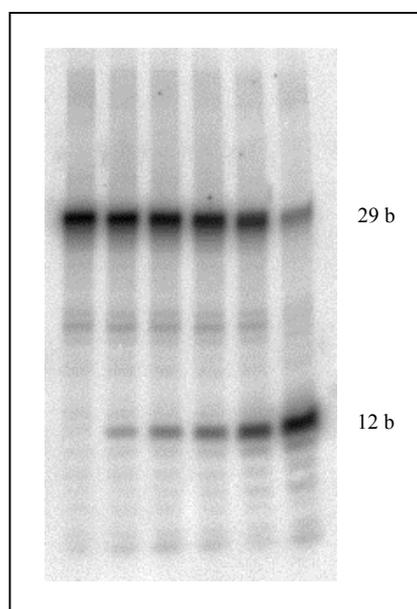


Abb. 3.10: Kinetischer Verlauf der Spaltung des Oligonukleotids B/C mit der Mutante M137Q unter Standardbedingungen (Auftrag v. l. n. r.: Standard-Oligo nativ (29 b), Zeitwerte 20, 40, 60, 120 s, Standard-Oligo gespalten (29 und 12 b))

Die kinetischen Untersuchungen wurden mit den Mutanten M137C, M137K, M137L und M137N und als Vergleich auch mit dem Wildtypenzym und der Mutante M137Q durchgeführt. In Tabelle 3.7 sind die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} (Spaltungen pro Enzymmolekül) in der Einheit min^{-1} angegeben.

Tab. 3.7: Geschwindigkeitskonstanten k_{app} der *EcoRI*-Mutanten für die Spaltung des Oligonukleotids B/C unter Standardbedingungen im Vergleich zum wt-*EcoRI* und zur Mutante M137Q

Enzym	k_{app} [min^{-1}]
wt- <i>EcoRI</i>	$2,3 \times 10^0$
M137Q	$8,9 \times 10^{-1}$
M137C	$2,1 \times 10^{-1}$
M137K	$2,3 \times 10^{-3}$
M137L	$2,9 \times 10^{-1}$
M137N	$3,5 \times 10^{-1}$

Die Mutanten M137C, M137L und M137N zeigten mit dem Oligonukleotid im Vergleich zu dem Wildtypenzym nur eine etwa um Faktor 10 verringerte Spaltgeschwindigkeit, obwohl sie in ihrer mit λ -DNA bestimmten spezifischen Spaltaktivität etwa um den Faktor 1000 von der des Wildtypenzym abweichen (siehe Tabelle 3.5). Eine Ausnahme bildete erneut die Mutante M137K, die auch mit dem Oligonukleotid eine sehr geringe Spaltaktivität aufwies.

Für die bereits von Küster (1998) charakterisierte Mutante M137Q wurde mit diesem Substrat eine etwas geringere Geschwindigkeitskonstante als die des Wildtypenzym ermittelt, obwohl sie λ -DNA sogar ein wenig schneller spaltete. Dieser geringe Unterschied kann darauf beruhen, daß für die Spaltungen verschiedene Proteinpräparationen verwendet wurden. Aufgrund der langen Lagerzeit und der geringen Menge von Küsters Proteinpräparation, wurde die Mutante für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des von Küster hergestellten Plasmids neu aufgereinigt (siehe 3.2).

3.4.2 Einzel- und Mehrfachmutanten mit den Mutationen M137Q, R200K und R203K

Zur Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI* soll der Kontakt zum gesamten GC-Basenpaar unter Einbeziehung der Mutation M137Q näher untersucht werden (siehe auch Anfang des Kapitels 3). Neben dem Met137 sind dabei die Aminosäuren Arg200 und Arg203 beteiligt. Sie bilden zu dem Guanin über ein zwischen DNA und ihnen gelagertes Wassermolekül Wasserstoffbrückenbindungen aus [Rosenberg, 1991]. Das Arginin an der Position 203 stellt zusätzlich einen Kontakt zum Phosphatrückgrat außerhalb der Erkennungssequenz her. Aufgrund des großen Abstands der Aminosäuren zur DNA kommt

für die zwei Positionen nur der Austausch gegen ebenfalls große Aminosäuren, wie zum Beispiel Lysin oder Tyrosin, in Frage.

Austausche gegen Lysin an beiden Positionen wurden bereits durchgeführt und untersucht [Alves *et al.*, 1989; Geiger *et al.*, 1989-b; Oelgeschläger *et al.*, 1990]. Die Mutanten zeigten für die Position 200 einen starken (etwa Faktor 1000) und für die Position 203 einen schwachen Verlust (etwa Faktor 10) der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym. Weitere Austausche an der Position 203 gegen Glutamin bzw. Glutaminsäure brachten nur inaktive Mutanten hervor [Oelgeschläger *et al.*, 1990]. Heitman & Model (1990-a) entwickelten einen *in vivo-Assay* zur Überprüfung der Spaltktivität von Mutanten und testeten damit alle möglichen Punktmutationen an der Position 200. Neben der Lysin-Mutante waren nur noch die R200C, R200S und R200V in der Lage, DNA zu spalten, allerdings mit noch geringerer Aktivität. Keine der Mutanten zeigte eine Änderung der Spezifität.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Austausche gegen Lysin an beiden Positionen und gegen Tyrosin an der Position 200 in Verbindung mit der Mutation M137Q eingehend untersucht. Daher wurden Mehrfachmutanten mit sämtlichen Kombinationen der Mutationen M137Q, R200K, R200Y und R203K hergestellt, wobei die Mutanten mit R200Y in einem gesonderten Kapitel (siehe 3.4.3) besprochen werden. Zur Vervollständigung der Charakterisierung und Ergebnisse und zum besseren Vergleich der Mutanten untereinander wurden ebenfalls alle jeweiligen Einzelmutanten generiert, da die früher hergestellten Mutanten im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit aufgereinigten Mutanten keinen Affinitätstag (Hexahistidintag) besitzen. Dieser Sachverhalt könnte ihren Vergleich untereinander beeinträchtigen, denn es wurde gezeigt, daß die Eigenschaften der Enzyme etwas voneinander abweichen können, je nachdem, ob und was für ein *Tag* fusioniert ist [Vennekohl, 1999], und welche Reaktionsbedingungen gewählt wurden.

3.4.2.1 Spaltung von λ -DNA

Die spezifische Aktivität der Mutanten R200K, R203K, R200K/R203K, M137Q/R200K, M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K wurde durch Spaltkinetiken bei 37 °C mit dem Substrat λ -DNA bestimmt. Dafür wurden jeweils verschiedene Enzymkonzentrationen und Zeitwerte getestet und so optimiert, daß eine Aktivitätsberechnung erfolgen konnte. In Tabelle 3.8 ist eine Übersicht über das Spaltverhalten der sechs Mutanten unter den vier

Pufferbedingungen (Standard, Mangan, Niedrigsalz pH 8,8 und Hochsalz pH 8,8; siehe 2.5.5) im Vergleich zum Wildtypenzym angegeben.

Tab. 3.8: Spezifische Spaltaktivität der *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum wt-*EcoRI*; ein Auftreten von *Starspaltung* im Anschluß an das kanonische Muster ist mit (*) gekennzeichnet

Enzym	Spezifische Spaltaktivität [U mg ⁻¹] unter Pufferbedingung			
	Standard	Mangan	Niedrigsalz pH 8,8	Hochsalz pH 8,8
wt- <i>EcoRI</i>	$1,8 \times 10^6$	<i>Starspaltung</i>	<i>Starspaltung</i>	$1,2 \times 10^6$
R200K	$1,3 \times 10^2$	$< 2,0 \times 10^2$	$6,3 \times 10^3$	keine Spaltung
R203K	$2,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^5$ (*)	$1,2 \times 10^5$
R200K/R203K	$2,4 \times 10^2$	$4,9 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^2$
M137Q/R200K	keine Spaltung	keine Spaltung	$1,6 \times 10^3$	keine Spaltung
M137Q/R203K	$2,1 \times 10^3$ (*)	$2,4 \times 10^4$ (*)	$4,8 \times 10^4$ (*)	$3,2 \times 10^3$ (*)
M137Q/R200K/ R203K	unspezifische Nukleaseaktivität	keine Spaltung	$5,3 \times 10^2$	keine Spaltung

Alle untersuchten *EcoRI*-Mutanten mit Ausnahme von R203K zeigten einen starken Verlust an katalytischer Aktivität. Bei den Mutanten M137Q/R200K und M137Q/R200K/R203K führten die Aminosäureaustausche sogar zur vollständigen Inaktivität des Enzyms sowohl unter Standard- als auch unter Mangan- und Hochsalz-Bedingungen. Sie konnten allerdings mit Niedrigsalz-*Star*bedingungen zu langsamer Spaltung der kanonischen Sequenz aktiviert werden. Darüber hinaus trat bei Spaltungen mit der Dreifachmutante M137Q/R200K/R203K unter Standardbedingungen eine unspezifische Nukleaseaktivität auf. Dieses Verhalten konnte sogar noch bis zu einer Enzymverdünnung von 6×10^5 , was einer Enzymkonzentration von 21 pM im Test entsprach, beobachtet werden. Nach Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 16 °C trat dieses Phänomen nicht mehr auf.

Das Verhalten der Mutanten R200K und R200K/R203K bestätigte die Ergebnisse früherer Arbeiten (siehe Erläuterungen in Kapitel 3.4.2). Beide besaßen unter Niedrigsalz-Bedingungen die größte spezifische Spaltaktivität, spalteten allerdings nur kanonische und keine *Star*sequenzen. In Abbildung 3.11 ist der Verlauf der kanonischen Spaltung von λ -DNA exemplarisch mit der Mutante R200K/R203K unter Niedrigsalz-Bedingungen dargestellt.

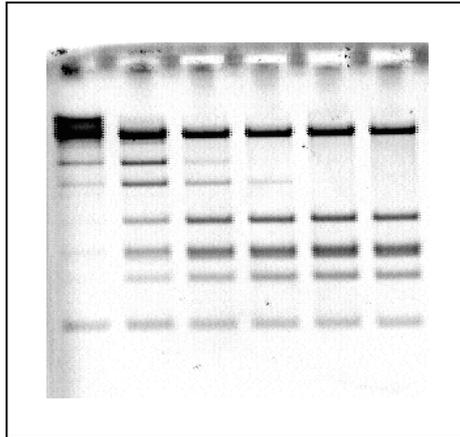


Abb. 3.11: Spaltkinetik der Mutante R200K/R203K (37 nM) mit λ -DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen (Auftrag v. l. n. r.: Zeitwerte 2, 5, 10, 15, 30, 60 min; letzter Zeitwert (60 min) entspricht dem Standard-Spaltmuster für *EcoRI*)

Zwei Ausnahmen in dieser Reihe von Mutanten bildeten sowohl die Mutante R203K aufgrund ihrer hohen spezifische Aktivität als auch die Mutante M137Q/R203K aufgrund ihrer starken Neigung zu *Starspaltung*. Die Einzelmutante R203K spaltete λ -DNA unter Standardbedingungen wie erwartet (siehe Erläuterungen in Kapitel 3.4.2) etwa zehnmal langsamer als das Wildtypenzym. In den anderen untersuchten Puffern zeigte sie, außer unter Mangan-Bedingungen, eine ähnlich hohe Aktivität, wobei sie im Niedrigsalz-Puffer nach Auftreten des kanonischen Spaltmusters *Starspaltung* zeigte. Abbildung 3.12 zeigt diesen Übergang von kanonischer zu *Starspaltung*. Unter den gewählten Bedingungen mit einer Enzymkonzentration von 26 nM hatte das Enzym bereits nach zehn Minuten (erster Zeitwert) alle fünf kanonischen Sequenzen gespalten. *Starspaltung* trat zwischen 45 und 90 Minuten auf.

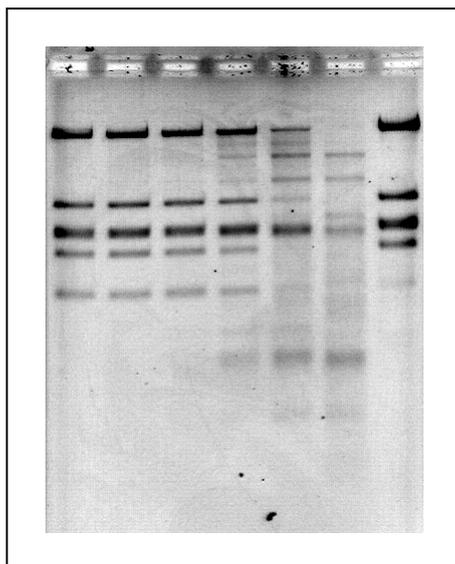


Abb. 3.12: Spaltkinetik der Mutante R203K (26 nM) mit λ -DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen (Auftrag v. l. n. r.: Zeitwerte 10, 20, 45, 90 min, 3 h, 6 h, Standard-Spaltmuster *Eco*RI: 21226, 7421, 5804, 5643, 4878 und 3530 bp)

Durch den zu R203K zusätzlichen Austausch M137Q verringerte sich die Aktivität des Enzyms, die allerdings sowohl mit Mangan-Puffer als auch mit Niedrigsalz-Bedingungen wieder gesteigert werden konnte. Was diese Doppelmutante M137Q/R203K auszeichnet, ist das Auftreten von *Starspaltung* unter allen getesteten Pufferbedingungen. Dieser Befund zeigt, daß durch die Aminosäureaustausche Met137 gegen Gln und Arg203 gegen Lys eine Beeinflussung der Kopplung zwischen DNA-Erkennung und Katalyse vorliegen muß, nämlich eine Relaxation der Kopplungsstringenz.

In Abbildung 3.13 ist das unter Niedrigsalz-Bedingungen auftretende *Starspaltmuster* der Mutante M137Q/R203K im Vergleich zu dem vom Wildtypenzym erzeugten dargestellt. Bei der Vielzahl der auf λ -DNA vorhandenen *Star*sequenzen ist eine Identifizierung der gespaltenen Sequenzen äußerst schwierig. Hier kann nur festgestellt werden, daß sich die erzeugten Spaltmuster unterscheiden, was sehr wahrscheinlich darauf beruht, daß die Mutante M137Q/R203K eine geringere Anzahl an *Star*sequenzen spaltet als das Wildtypenzym. Um nähere Aussagen darüber zu treffen, welche *Star*sequenzen von welchem Enzym bevorzugt werden, wurden unter den oben genannten Bedingungen Spaltuntersuchungen mit Plasmiden durchgeführt (siehe 3.4.2.2).

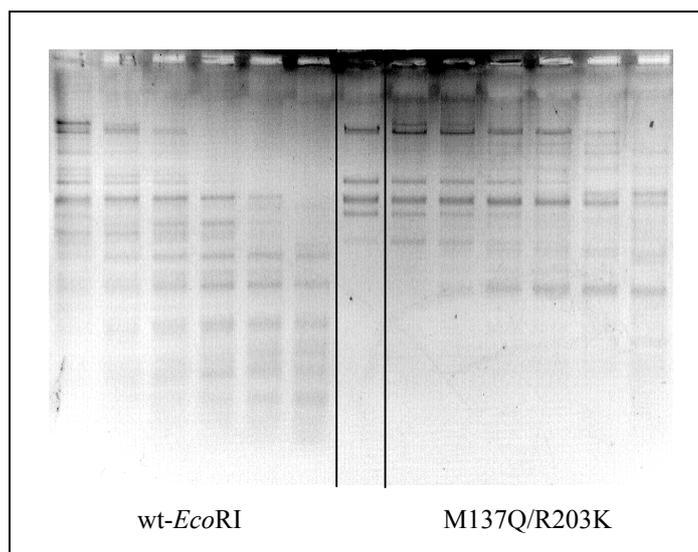


Abb. 3.13: *Starspaltung* der Mutante M137Q/R203K (168 nM) mit λ -DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen im Vergleich zum wt-*EcoRI* (233 nM)
(Auftrag v. l. n. r.: Kinetik des wt-*EcoRI*, Standard-Spaltmuster *EcoRI*, Kinetik der Mutante M137Q/R203K; Zeitwerte jeweils 2, 5, 10, 15, 30, 60 min)

Außer den in Tabelle 3.8 angegebenen Spaltaktivitäten und -eigenschaften, die mit niedrigen Enzymkonzentrationen ermittelt wurden, zeigten sowohl die Mutante R203K als auch die aus ihr hervorgehende Doppelmutante M137Q/R203K bei Enzymkonzentrationen größer 1 μ M eine weitere Besonderheit. Unter Standardbedingungen trat sofort *Starspaltung* auf. Solch ein Verhalten wurde erstmals von Pingoud (1985) für das Wildtypenzym beschrieben. Bei diesen beiden Mutanten kann es auf den Einfluß der Mutation R203K zurückgeführt werden. Die anderen Mutanten dieser Reihe zeigten trotz einer Enzymkonzentration von mehr als 1 μ M im Test keine *Starspaltung*.

3.4.2.2 Spaltung von Plasmiden

Zur weiteren Untersuchung der Spalteigenschaften wurden alle sechs *EcoRI*-Mutanten mit dem Plasmid pRIF309+ als Substrat unter den vier angegebenen Pufferbedingungen getestet (siehe 2.5.6). Das Plasmid besitzt drei kanonische *EcoRI*-Spaltstellen und 23 *Star*sequenzen. Für die Mutanten R200K, R200K/R203K und M137Q/R200K bestätigten sich durch die Plamid-Kinetiken tendenziell die mit der Spaltung von λ -DNA erhaltenen Ergebnisse. Die Enzyme zeigten unter Standard-, Mangan- und Hochsalz-Bedingungen keine oder nur sehr langsame Spaltung. Unter Niedrigsalz-Bedingungen erfolgte eine Steigerung der Aktivität, die teilweise zur vollständigen Spaltung der drei kanonischen Erkennungssequenzen führte. Eine *Starspaltung* trat auch bei diesen Untersuchungen nicht auf.

Die Dreifachmutante M137Q/R200K/R203K, die bei der Spaltung von λ -DNA unter Standardbedingungen eine unspezifische Nukleaseaktivität aufwies, zeigte dieses Verhalten mit Plasmiden nicht. Hier konnte sogar bei genügend langer Inkubationszeit (über Nacht) und hoher Enzymkonzentration (1 μ M) die Spaltung der drei spezifischen Sequenzen erreicht werden. Ansonsten erfolgte wie bei den Untersuchungen mit λ -DNA im Mangan- und Hochsalz-Puffer keine bzw. nur langsame Linearisierung des Plasmids, unter Niedrigsalz-Bedingungen wurden die kanonischen Sequenzen vollständig gespalten.

Für die Einzelmutante R203K konnte eine Staffelung der Spaltaktivität festgestellt werden. Sie war am geringsten unter Standard- und Hochsalz-Bedingungen, höher im Mangan-Puffer und am höchsten unter Niedrigsalz-Bedingungen, unter denen das Enzym auch hier wie erwartet nach Auftreten des kanonischen Spaltmusters dem Wildtypenzym ähnliche *Starspaltung* zeigte (siehe Abbildung 3.14). Die Ergebnisse decken sich nicht vollständig mit den zuvor mit λ -DNA erhaltenen (siehe Tabelle 3.8), wonach das Enzym im Mangan-Puffer am langsamsten reagierte. Unter Standardbedingungen mit einer Enzymkonzentration von 1 μ M trat ebenfalls bei diesen Untersuchungen *Starspaltung* auf, allerdings erst nach vollständiger Spaltung der drei spezifischen Sequenzen.

Das zuletzt beschriebene Verhalten wurde auch mit der Mutante M137Q/R203K beobachtet, allerdings vollzog sich der Übergang von kanonischer zu *Starspaltung* bereits vor Beendigung der spezifischen Spaltung. Ansonsten entsprachen die mit dem Plasmid unter den verschiedenen Pufferbedingungen getesteten Spaltaktivitäten weitestgehend den mit λ -DNA ermittelten, jedoch trat nur im Niedrigsalz-Puffer *Starspaltung* auf. Diese erfolgte ebenfalls bereits vor Beendigung der spezifischen Spaltung. Das dabei entstandene Muster war dem vom Wildtypenzym erzeugten ähnlich (siehe Abbildung 3.14).

Zum Vergleich der entstehenden Spaltmuster sind in Abbildung 3.14 die Verläufe der *Starspaltungen* der *EcoRI*-Mutanten R203K und M137Q/R203K und des Wildtypenzyms nebeneinander gestellt. Eine Auswertung der von den beiden Mutanten und dem Wildtypenzym gespaltenen *Starsequenzen* des Plasmids pRIF309+ erfolgte aufgrund der Vielzahl der Sequenzen nicht (siehe auch 3.4.1.2). Das Wildtypenzym spaltet eine größere Anzahl an *Starsequenzen* als die Mutanten. Darüber hinaus ist allerdings kein gravierender Unterschied in den Mustern untereinander erkennbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß dieselben Sequenzen bevorzugt werden.

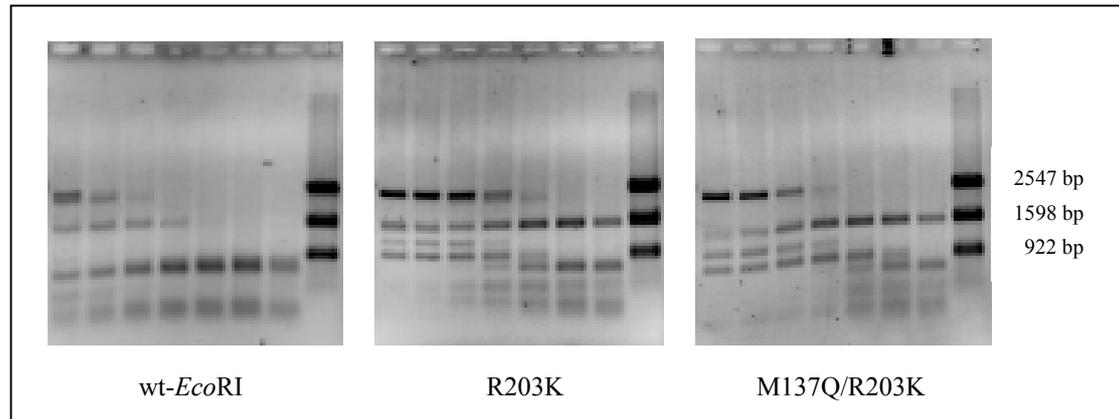


Abb. 3.14: *Starspaltung* der Mutanten R203K (262 nM) und M137Q/R203K (168 nM) mit dem Plasmid pRIF309+ unter Niedrigsalz-Bedingungen im Vergleich zum wt-*EcoRI* (233 nM) (Auftrag jeweils v. l. n. r.: Zeitwerte 10, 20, 45, 90 min, 3, 6, 24 h, Standard-Spaltmuster *EcoRI*)

Zur Analyse, welche *Star*sequenzen von den Mutanten R203K und M137Q/R203K gespalten werden, wurden zusätzlich Kinetiken mit den Plasmiden pBR322 und pUC8 als Substrat unter Niedrigsalz-Bedingungen durchgeführt. pBR322 und pUC8 besitzen jeweils eine *EcoRI*-Spaltstelle. Die Anzahl der *Starspaltstellen* beträgt elf für pBR322 und vier für pUC8. Zum Vergleich der Art und Anzahl der gespaltenen Sequenzen wurden die Spaltungen auch mit dem Wildtypenzym durchgeführt. Dieses spaltete vier der elf *Starspaltstellen* auf pBR322 und zwei der vier auf pUC8. In Tabelle 3.9 sind die von den Enzymen gespaltenen Sequenzen zusammengefaßt.

Tab. 3.9: Von den Mutanten R203K und M137Q/R203K unter Niedrigsalz-Bedingungen gespalte *Star*sequenzen der Plasmide pBR322 und pUC8 im Vergleich zum Wildtypenzym; sehr langsam und unvollständig gespalte Sequenzen sind in Klammern gesetzt

Plasmid	von Enzym gespaltene <i>Star</i> sequenzen		
	wt- <i>EcoRI</i>	R203K	M137Q/R203K
pBR322	TAATTC	TAATTC	TAATTC
	GAAGTC	(GAAGTC)	(GAATGC)
	GAGTTC	(GAGTTC)	
	GAATGC	(GAATGC)	
pUC8	TAATTC	TAATTC	TAATTC
	GAGTTC	(GAGTTC)	

Die Mutanten gingen nach vollständiger Spaltung der kanonischen Sequenz in *Starspaltung* über. Die *Starsequenz* TAATTC wurde von beiden Enzymen am schnellsten gespalten. Des Weiteren spaltete die Doppelmutante M137Q/R203K die auf dem Plasmid pBR322 vorhandene Sequenz GAATGC, jedoch nur sehr langsam und nicht vollständig, was in der Tabelle 3.9 dadurch kenntlich gemacht ist, daß die Sequenz in Klammern gesetzt wurde. Die Einzelmutante R203K war in der Lage, dieselben *Starsequenzen* wie das Wildtypenzym zu spalten. Dieses geschah allerdings ebenfalls nur langsam und zu einem geringen Teil.

3.4.2.3 Spaltung von Oligonukleotiden

Als dritte Charakterisierungsmethode und zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} wurden Spaltungen mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotidpaar B/C durchgeführt (siehe 2.5.7).

Die Untersuchungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur. In Tabelle 3.10 sind die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} (Spaltungen pro Enzymmolekül) in der Einheit min^{-1} angegeben.

Tab. 3.10: Geschwindigkeitskonstanten k_{app} der *EcoRI*-Mutanten für die Spaltung des Oligonukleotids B/C unter Standardbedingungen im Vergleich zum *wt-EcoRI*

Enzym	k_{app} [min^{-1}]
<i>wt-EcoRI</i>	$2,3 \times 10^0$
R200K	$1,8 \times 10^{-1}$
R203K	$1,2 \times 10^0$
R200K/R203K	$1,9 \times 10^{-2}$
M137Q/R200K	$7,3 \times 10^{-2}$
M137Q/R203K	$1,8 \times 10^{-1}$
M137Q/R200K/R203K	$2,3 \times 10^{-4}$

Mit dieser Charakterisierungsmethode wurden für alle untersuchten Mutanten hohe Geschwindigkeitskonstanten ermittelt (vergleiche Tabelle 3.8). Sogar die auf λ -DNA fast inaktiven Mutanten M137Q/R200K und M137Q/R200K/R203K spalteten das Oligonukleotid,

so daß Werte bestimmt werden konnten. Der für die Doppelmutante wich nur um etwa Faktor 30 von dem des Wildtypenzym ab.

Die Mutante R203K, die sich bereits während der anderen Untersuchungen durch ihre hohe Aktivität auszeichnete, war hier annähernd so schnell wie das Wildtypenzym.

Obwohl die Einzelmutanten M137Q (siehe 3.4.1) und R203K sehr aktive Enzyme sind, werden durch den gleichzeitigen Austausch beider Positionen Enzyme generiert, die in ihrer Aktivität beeinträchtigt, aber trotzdem in der Lage sind, die kanonische *EcoRI*-Erkennungssequenz zu spalten, wie zum Beispiel die Dreifachmutante M137Q/R200K/R203K. Eine Änderung der Spezifität allein durch diese zwei Mutationen konnte nicht erreicht werden.

3.4.3 Einzel- und Mehrfachmutanten mit den Mutationen M137Q, R200Y und R203K

Zur näheren Untersuchung des Kontakts zum gesamten GC-Basenpaar der Erkennungssequenz wurde an Arg200 sowohl Lysin als auch Tyrosin eingeführt. Die Lysin-Mutanten wurden bereits in Kapitel 3.4.2 besprochen. In diesem Kapitel erfolgt die Charakterisierung der Einzelmutante R200Y und der Mehrfachmutanten M137Q/R200Y, R200Y/R203K und M137Q/R200Y/R203K.

3.4.3.1 Spaltung von λ -DNA

Die Spaltaktivitäten der Mutanten R200Y, M137Q/R200Y, R200Y/R203K und M137Q/R200Y/R203K wurden zunächst mit λ -DNA als Substrat unter den vier Pufferbedingungen (Standard, Mangan, Niedrigsalz pH 8,8 und Hochsalz pH 8,8) getestet (siehe 2.5.5). Dabei verhielten sich alle vier Mutanten gleich: Unter Standard-, Niedrigsalz- und Hochsalz-Bedingungen erfolgte keine Spaltung, unter Mangan-Bedingungen trat eine unspezifische Nukleaseaktivität auf. Ein unspezifischer Abbau der DNA konnte bei langer Inkubationszeit ebenfalls im Standard-Puffer detektiert werden.

Anscheinend überwiegt bei diesen Mutanten der Einfluß von R200Y. Selbst die einzelne Mutation bewirkt die vollständige Inaktivierung des Enzyms. Diese Wirkung kann durch die zusätzlichen Mutationen, die für sich genommen nur schwache (R203K) bzw. keine (M137Q) Beeinträchtigung des Enzyms hervorrufen, nicht aufgehoben werden.

Die Inaktivität der Mutanten kann neben anderen Ursachen darin begründet sein, daß die Einzelmutante R200Y in ihrer Struktur beeinträchtigt ist. Sie besitzt weniger α -Helix-Anteil als das Wildtypenzym (siehe 3.3).

3.4.3.2 Spaltung von Plasmiden

Aufgrund der durch Spaltungen mit λ -DNA festgestellten Inaktivität der Enzyme wurden die Mutanten mit Plasmiden als Substrat getestet (siehe 2.5.6). Hierbei kann neben der Detektion einer Restaktivität auch festgestellt werden, ob die Enzyme ein sogenanntes *Nicking*, die Spaltung nur eines Strangs, durchführen.

Als Substrate dienten die beiden Plasmide pRIF309+ und pUC8. pRIF309+ besitzt drei und pUC8 eine kanonische *EcoRI*-Spaltstelle. Es wurden Kinetiken unter allen vier angegebenen Pufferbedingungen bei 37 °C durchgeführt.

Die drei Mutanten R200Y, M137Q/R200Y und R200Y/R203K zeigten das gleiche Verhalten. Das Plasmid pRIF309+ wurde entweder nicht gespalten (Niedrigsalz- und Hochsalz-Bedingungen) oder zu einem geringen Teil linearisiert (Standard- und Mangan-Bedingungen). Bei den Spaltungen des Plasmids pUC8 konnte auch im Hochsalz-Puffer eine Anlinearisierung des Plasmids beobachtet werden. Zusätzlich erfolgte unter Standardbedingungen neben der Anlinearisierung ein unspezifischer Abbau der DNA.

Die Dreifachmutante M137Q/R200Y/R203K unterschied sich von den anderen Mutanten insofern, daß sie mit beiden Plasmiden unter Standardbedingungen neben der Anlinearisierung unspezifischen Abbau der DNA zeigte und im Hochsalz-Puffer das Plasmid pRIF309+ und im Niedrigsalz-Puffer das Plasmid pUC8 anlinearisierte.

Die Spaltuntersuchungen mit Plasmiden zeigten, daß durch Vorhandensein von superhelikaler DNA eine geringe Restaktivität der Enzyme hervorgerufen werden konnte. Ansonsten scheint die Mutation R200Y die Enzyme zu inaktivieren.

3.4.3.3 Spaltung von Oligonukleotiden

Die vier *EcoRI*-Mutanten wurden ebenfalls mit dem Oligonukleotid B/C als Substrat untersucht (siehe 2.5.7). Diese Charakterisierungsmethode ermöglicht den Nachweis geringster Mengen gespaltenen DNA, da das Detektionssystem sehr empfindlich ist.

Die Untersuchungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid bei Raumtemperatur sowohl unter Standard- als auch unter Mangan-Bedingungen (siehe 2.5.5), da unter diesen Bedingungen eine Anlinearisierung von Plasmid-DNA beobachtet werden konnte. Das Enzym wurde jeweils in der höchstmöglichen Konzentration eingesetzt. Diese bestimmte sich durch den Gehalt an NaCl in der Proteinlösung (300 mM; siehe 2.4.4), da im Reaktionsansatz nur maximal 50 mM enthalten sein darf.

Einzig unter Standardbedingungen war nach langer Inkubationszeit (über Nacht) für alle Mutanten eine schwach detektierbare Spaltung zu erkennen. Eine quantitative Auswertung war nicht möglich. Unter Mangan-Bedingungen wurde keine Spaltung nachgewiesen.

Neben dem Oligonukleotid B/C wurden die Mutanten auch mit dem Oligonukleotid „MunI-AT“ (siehe Tabelle 2.5), welches eine *MunI*-Erkennungssequenz zentral enthält, getestet. Die Erläuterungen und Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3.7 aufgeführt.

3.4.4 Mutanten mit dem *MunI*-Aminosäuresequenzmotiv Ala-Gly-Arg

Ein weiterer Ansatz zur Veränderung der Sequenzspezifität beruht auf der Homologie zwischen den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *MunI* (siehe auch Anfang des Kapitels 3). Die Enzyme erkennen sehr ähnliche Sequenzen (GAATTC bzw. CAATTG) und ihre Aminosäuresequenzen weisen in Teilbereichen eine Übereinstimmung von 75 bis 100 % auf [Siksnys *et al.*, 1994]. Außerdem werden für die Erkennung der zentralen AATT-Sequenz vergleichbare Strukturelemente benutzt. Für die CG-Basenerkennung ist bei *MunI* ein Arginin an der Position 115 verantwortlich [Deibert *et al.*, 1999]. Diese Position entspricht dem Ala139 in *EcoRI*. Die übrigen in *EcoRI* an der Basenerkennung beteiligten Aminosäuren des *Extended chain*-Motivs sind Met137 und Ala138. Durch Ersetzen sowohl dieser als auch Ala139 durch die in *MunI* an den Positionen 113 bis 115 vorhandenen Aminosäuren Alanin, Glycin und Arginin entspräche das *Extended chain*-Motiv (Aminosäuren 137 bis 142) vollständig dem Erkennungsmotiv der *MunI*. Dadurch wäre die Erkennung des äußeren Basenpaares beeinträchtigt und die Möglichkeit zur Spezifitätsveränderung gegeben.

Ein solcher Austausch des kompletten *Extended chain*-Motivs der *EcoRI* (MAAGNA) gegen die entsprechende Aminosäuresequenz der *MunI* (AGRGNA) wurde bereits von Fritz (1994) durchgeführt. Die Mutante (*EcoMun**His₆) zeigte keine Spaltaktivität.

Zusätzlich zu den Aminosäureaustauschen an den Positionen 137 bis 139 können erneut Mutationen an den Positionen 200 und 203, die ebenfalls an der Erkennung des äußeren Basenpaares beteiligt sind, durchgeführt werden (siehe 3.4.2 und 3.4.3). Da die bisherigen Untersuchungen an den Positionen 200 und 203 zeigten, daß ein Austausch an beiden Positionen gegen Lysin in aktiven, der Austausch R200Y allerdings in inaktiven Enzymen resultierte, wurden nur die Lysin-Mutationen zusätzlich eingeführt.

Es wurden daher die beiden Vierfachmutanten, die die Mutation M137A/A138G/A139R in Kombination mit R200K bzw. R203K tragen, generiert und biochemisch untersucht. Zur Vervollständigung der Charakterisierung und Ergebnisse und zum besseren Vergleich der

Mutanten untereinander wurde die Dreifachmutante M137A/A138G/A139R ebenfalls erneut hergestellt.

3.4.4.1 Spaltung von λ -DNA

Die Spaltaktivität der Mutanten M137A/A138G/A139R, M137A/A138G/A139R/R200K und M137A/A138G/A139R/R203K wurde zunächst mit λ -DNA als Substrat unter den vier Pufferbedingungen (Standard, Mangan, Nidrigsalz pH 8,8 und Hochsalz pH 8,8) getestet (siehe 2.5.5).

Bei keiner der drei Mutanten konnte Spaltung beobachtet werden. Bei langer Inkubationszeit (über Nacht) trat mehr oder weniger ausgeprägt ein unspezifischer Abbau der DNA auf. Diese Ergebnisse sind konform mit denen von Fritz (1994).

Die Mehrfachmutation bewirkt eine Inaktivierung des Enzyms. Ob darüber hinaus eine Änderung oder Erweiterung der Spezifität erreicht wurde, ist aufgrund der Inaktivität nicht zu beurteilen.

3.4.4.2 Spaltung von Plasmiden

Um zu überprüfen, ob die drei Mutanten eine Restaktivität besitzen, wurden mit den Plasmiden pRIF309+ und pUC8 als Substrat unter allen vier angegebenen Pufferbedingungen bei 37 °C Kinetiken durchgeführt (siehe 2.5.6 und 3.4.1.2).

Die Dreifachmutante M137A/A138G/A139R schien von den drei Enzymen die spaltaktivste zu sein. Sie war in der Lage, beide Plasmide in jedem Puffer zu einem geringen Teil zu linearisieren. Mit dem Plasmid pUC8 trat neben der Anlinearisierung eine unspezifische Nukleaseaktivität auf.

Die beiden Vierfachmutanten verhielten sich ähnlich. Mit dem Plasmid pRIF309+ konnte nur unter Standardbedingungen eine teilweise Linearisierung erreicht werden. Ansonsten wurde keine Spaltung beobachtet. Das Plasmid pUC8 wurde in allen vier Puffern etwas anlinearisiert, wobei im Standard-Puffer zusätzlich ein unspezifischer Abbau der DNA erfolgte.

Die Spaltuntersuchungen mit Plasmiden zeigten, daß durch Vorhandensein von superhelikaler DNA eine geringe Restaktivität der Enzyme hervorgerufen werden konnte.

3.4.4.3 Spaltung von Oligonukleotiden

Die drei *EcoRI*-Mutanten mit dem *MunI*-Aminosäuresequenzmotiv wurden ebenfalls mit dem Oligonukleotid B/C als Substrat untersucht (siehe 2.5.7). Durch die hohe Empfindlichkeit des Detektionssystems können mit dieser Methode geringste Mengen an gespaltener DNA nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid bei Raumtemperatur sowohl unter Standard- als auch unter Hochsitz-Bedingungen (siehe 2.5.5), da dabei während der Spaltungen von Plasmiden die höchste Aktivität zu beobachten war. Die Enzyme wurden jeweils in den höchstmöglichen Konzentrationen eingesetzt (siehe 3.4.3.3).

Nur die schon zuvor als aktivstes Enzym ermittelte Dreifachmutante M137A/A138G/A139R zeigte mit dem Oligonukleotid B/C unter Standardbedingungen nach langer Inkubationszeit (über Nacht) eine kaum erkennbare Spaltung. Eine quantitative Auswertung war nicht möglich. Für die übrigen Mutanten wurde keine Spaltung detektiert.

Neben dem Oligonukleotid B/C wurden die Mutanten auch mit dem Oligonukleotid „MunI-AT“ (siehe Tabelle 2.5), welches eine *MunI*-Erkennungssequenz zentral enthält, getestet. Die Erläuterungen und Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3.7 aufgeführt.

3.5 Untersuchung des Bindungsverhalten der *EcoRI*-Mutanten

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der hergestellten *EcoRI*-Mutanten an DNA und zur Bestimmung der Bindungskonstante K_{ass} wurden Gelretardationsexperimente mit verschiedenen Substraten durchgeführt (siehe 2.5.8). Grundlegend dabei ist das veränderte Laufverhalten (Retardation) von proteingebundener DNA im Vergleich zu freier DNA in einem nativen Gel. Bei Verwendung eines radioaktiv markierten DNA-Substrats kann durch Quantifizierung der freien und gebundenen DNA bei einer gegebenen Proteinkonzentration die Bindungskonstante mit der unter 2.5.8.2 aufgeführten Formel berechnet werden.

3.5.1 Bindung an ein 174 bp-Fragment

Zunächst wurde das Bindungsverhalten der *EcoRI*-Mutanten mit einem PCR-Produkt von 174 bp Länge, das eine *EcoRI*-Erkennungssequenz zentral enthält, untersucht. Die Amplifikation des PCR-Produkts wurde wie in Kapitel 2.5.8.1 beschrieben durchgeführt. Die Bindung erfolgte mit gleichbleibender Substratkonzentration von 1 nM bei Raumtemperatur

im Bindungspuffer bei einem pH-Wert von 7,5. Das Enzym wurde in einem Verhältnis von 50:1 bis 5:1 (Enzym:Substrat) dazugegeben.

In Abbildung 3.15 ist exemplarisch das Bindungsverhalten der Mutanten M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K dargestellt. Es ist deutlich eine sogenannte Leiterbildung zu erkennen, die dadurch hervorgerufen wird, daß mehr als ein Protein pro DNA-Molekül gebunden ist. Diese zusätzliche Bindung kann nur auf einem langen Substrat erfolgen, bei dem gewährleistet ist, daß neben der spezifischen Erkennungssequenz genügend Platz zur Bindung des Proteins vorhanden ist. Es handelt sich dabei um eine unspezifische Bindung, die in der Regel um den Faktor 1000 schwächer ist als die spezifische, die in der Größenordnung von 10^8 bis 10^9 M^{-1} liegt. Bei Auftreten dieser Leitern kann die Bindungskonstante nicht mit der unter 2.5.8.2 aufgeführten Formel berechnet werden.

Sowohl das Wildtypenzym als auch alle Mutanten, die mit diesem *Shift*substrat eine detektierbare Bindung eingingen (M137K, M137L, M137N, R200K, R203K, R200K/R203K, M137Q/R200K), zeigten dieses in Abbildung 3.15 dargestellte Verhalten.

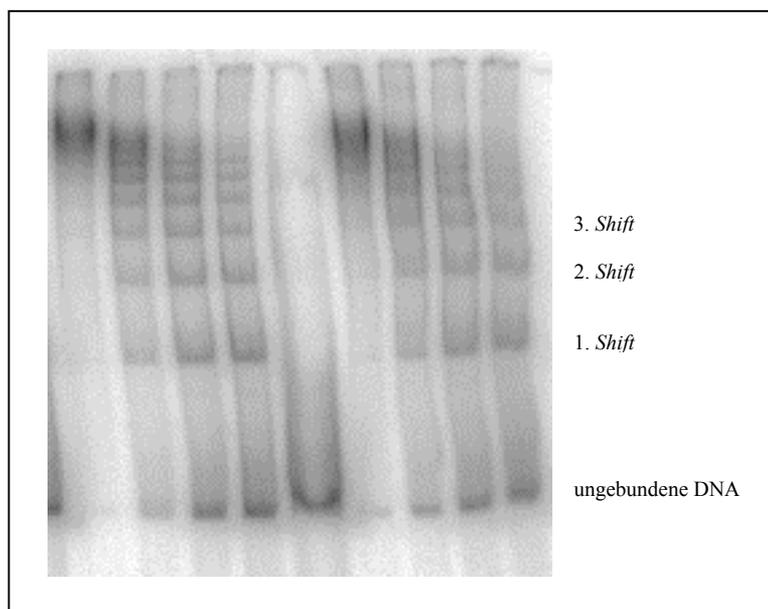


Abb. 3.15: *Mobility shift* der Mutanten M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K mit einem 174 bp-Fragment bei einer Substratkonzentration von 1 nM und einer Proteinkonzentration von 50, 20, 10 und 5 nM (Auftrag v. l. n. r.: *Shift* der Mutante M137Q/R203K, Standard-native DNA, *Shift* der Mutante M137Q/R200K/R203K; Proteinkonzentration jeweils nach rechts abnehmend)

Mit der Mutante M137C und den übrigen, in den kinetischen Untersuchungen als inaktive Enzyme ermittelten Mutanten R200Y, M137Q/R200Y, R200Y/R203K, M137Q/R200Y/R203K, M137A/A138G/A139R, M137A/A138G/A139R/R200K und M137A/A138G/A139R/R203K konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Die Leiterbildung im *Mobility shift assay* könnte außer durch unspezifische Bindung in der Aggregatbildung der Enzyme über den Hexahistidintag begründet sein. Fusionsproteine mit dieser Art von *Tag* neigen zur Aggregation, was durch Ultrazentrifugationsexperimente mit dem Wildtypenzym bewiesen wurde [Vennekohl, 1999].

Um diese Leiterbildung zu verhindern, wurden in weiteren Experimenten die Versuchsbedingungen variiert. Zunächst wurde die Substratkonzentration von 1 nM auf 0,1 nM reduziert. So konnte auch das Enzym in einer höheren Verdünnung eingesetzt werden, was der Aggregatbildung durch Verringerung der Anzahl der in der Lösung enthaltenen Moleküle entgegenwirkt. Außerdem wurden dem Bindungspuffer in getrennten Ansätzen Imidazol (25, 50 und 100 mM) und Histidin (1 μ M) zugesetzt. Durch die Zugabe von Imidazol, sowie dem davon abgeleiteten Histidin sollen die Hexahistidintags der einzelnen Proteine abgesättigt werden, so daß eine Aggregation der Proteine untereinander unwahrscheinlich wird.

Abbildung 3.16 zeigt das Bindungsverhalten der Mutante M137Q/R203K bei einer Substratkonzentration von 0,1 nM und einem Zusatz von Imidazol.

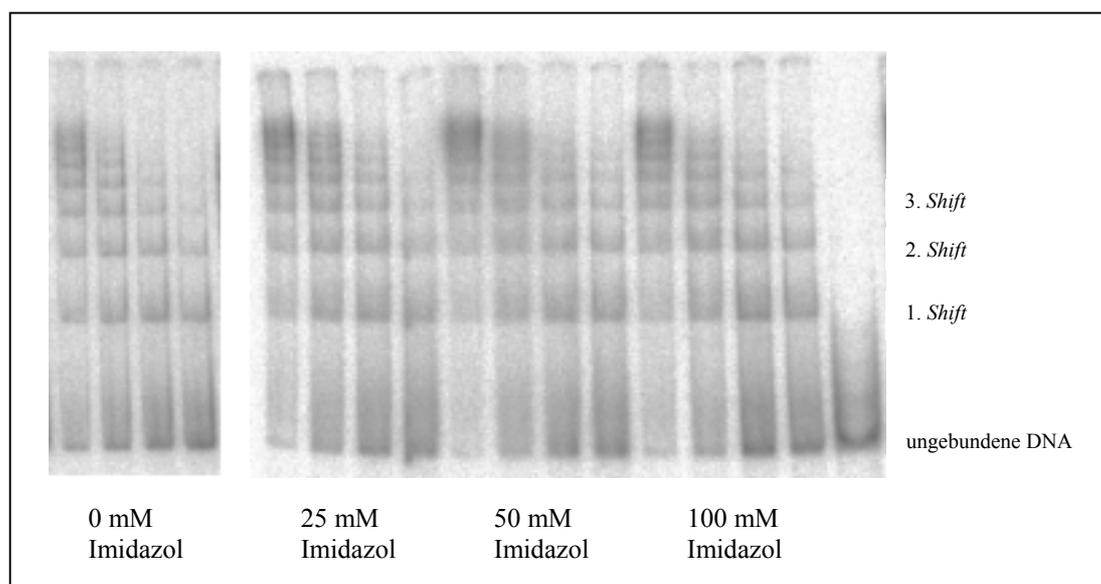


Abb. 3.16: *Mobility shift* der Mutante M137Q/R203K mit dem 174 bp-Fragment mit variabler Zugabe von Imidazol bei einer Substratkonzentration von 0,1 nM und einer Proteinkonzentration von 5, 2, 1 und 0,5 nM (Auftrag v. l. n. r.: steigende Imidazolkonzentration, dabei Proteinkonzentration jeweils abnehmend, Standard-native DNA)

Eine Zugabe von Imidazol bewirkte keine Änderungen bei der Leiterbildung. Das Bindungsverhalten der Mutante sah für alle vier untersuchten Bedingungen gleich aus. Allerdings war ein Unterschied durch Erniedrigung der Substratkonzentration festzustellen. Bei einer geringeren Menge an Substrat ist die Leiterbildung nicht so stark ausgeprägt wie bei 1 nM.

Die Zugabe von Histidin erbrachte ebenfalls keine Änderung des Bindungsverhalten.

Ein weiterer Ansatz zur Verhinderung der Leiterbildung bestand darin, die für die Bindungsansätze nötigen Enzymverdünnungen bei saurem pH-Wert durchzuführen. Bislang erfolgte dies bei einem pH-Wert von 7,5, bei dem auch die Bindung stattfindet. Im sauren Milieu werden Histidine protoniert, so daß eine Zusammenlagerung der Hexahistidintags untereinander nicht mehr erfolgen kann. Getestet wurden Verdünnungspuffer mit den pH-Werten 5,5 und 6,0, in denen die untersuchten Enzyme eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Auch durch diese Variation der Versuchsbedingungen konnte keine Änderung erreicht werden, es kam unabhängig vom pH-Wert des Verdünnungspuffers zu einer gleichbleibenden Leiterbildung.

Abschließend wurde der *Mobility shift assay* in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten in früheren Arbeiten [Windolph & Alves, 1997-a; Küster, 1998; Rosati, 1999] Bindungskonstanten von *EcoRI*-Mutanten ermittelt werden, die unter den zuvor getesteten Bedingungen in Abwesenheit des Kofaktors Mg^{2+} keine Bindung zeigten. Für die Untersuchungen wurde das EDTA sowohl im Bindungspuffer als auch im Laufpuffer durch 1 mM CaCl_2 ersetzt. Unter diesen Bedingungen erfolgte mit dem Wildtypenzym und den untersuchten Mutanten R203K, R200K/R203K, M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K keine Leiterbildung. Allerdings wurde auch nahezu keine spezifische Bindung (1. *Shift*) beobachtet und der Hauptanteil der proteingebundenen DNA war nicht in das Gel eingewandert. Dieser Sachverhalt spricht für noch höhere Aggregationsbildung als unter den zuvor getesteten Bedingungen ohne Calcium-Ionen. So konnten auch mit diesen veränderten Versuchsbedingungen keine Bindungskonstanten bestimmt werden.

Trotz Variation der Versuchsbedingungen, die einer Aggregation der Proteine über ihren Hexahistidintag entgegenwirken sollten, konnten die Ergebnisse in Bezug auf die Leiterbildung reproduziert werden. Dies deutet darauf hin, daß der Grund für die Leiterbildung vermutlich nicht im Vorhandensein des Hexahistidintags zu suchen ist, sondern vielmehr an dem Protein selbst liegt, da es in der Lage ist, oligomere Zustände (Tetramer, Oktamer, höhere Aggregate) einzunehmen, was sowohl durch Ultrazentrifugationsexperimente mit einem affinitätstagnfreien Wildtypenzym ermittelt [Vennekohl, 1999] als auch in früheren Arbeiten beschrieben wurde [Modrich & Zabel, 1976; Luke & Halford, 1985].

Da mit dem hier eingesetzten DNA-Fragment für die *EcoRI*-Mutanten keine Bindungskonstanten ermittelt werden konnten, wurden im folgenden andere DNA-Substrate im *Mobility shift assay* getestet (siehe 3.5.2 und 3.5.3).

3.5.2 Bindung an ein 468 bp-Fragment

Aufgrund der Leiterbildung in den vorangegangenen Bindungsexperimenten wurde das Bindungsverhalten ausgewählter *EcoRI*-Mutanten mit einem weiteren DNA-Substrat von 468 bp Länge untersucht (siehe 2.5.8). Dieses Substrat ist ebenfalls ein PCR-Produkt, dessen Amplifikation analog dem 174 bp langen *Shift*substrat wie in Kapitel 2.5.8.1 beschrieben durchgeführt wurde.

Die Bindung erfolgte mit einer gleichbleibenden Substratkonzentration von 1 nM bei Raumtemperatur im Bindungspuffer bei einem pH-Wert von 7,5 mit dem Wildtypenzym und den Mutanten M137C, M137L, M137Q, R200K, R203K, R200K/R203K, M137Q/R200K, M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K. Die Enzyme wurden in einem Verhältnis von 20:1 bis 5:1 (Enzym:Substrat) dazugegeben (siehe 2.5.8.2).

Auch mit diesem Substrat zeigten alle Enzyme außer der Mutante M137C, mit der wie zuvor keine Bindung nachgewiesen werden konnte, eine Leiterbildung. So konnte erneut keine Bindungskonstante mit der unter 2.5.8.2 aufgeführten Formel berechnet werden. Aus diesem Grund wurde die Auswertung so modifiziert, daß die unspezifische Bindung in den höheren *Shift*banden (2. bis 6. *Shift*) berücksichtigt und in die Berechnung miteinbezogen wurde. Auf diese Weise läßt sich neben der spezifischen Bindung ebenfalls die unspezifische ermitteln. Allerdings erfolgte die Berechnung unter der Annahme, daß das Protein auf jeden Fall an der kanonischen Sequenz bindet, bevor eine zusätzliche unspezifische Bindung stattfindet. Das heißt, daß bei jedem proteingebundenen DNA-Molekül die spezifische Erkennungssequenz besetzt ist.

In Tabelle 3.11 sind die Werte der so ermittelten Bindungskonstanten für die spezifische ($K_{\text{ass}}(\text{spez.})$) und die unspezifische ($K_{\text{ass}}(\text{unspez.})$) Bindung der oben genannten Enzyme angegeben.

Tab. 3.11: Durch Gelretardation mit dem 468 bp langen *Shift*substrat ermittelte Konstanten K_{ass} für spezifische (spez.) und unspezifische (unspez.) Bindung der ausgewählten *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum wt-*EcoRI*; die Berechnung der Werte erfolgte unter Einbeziehung der höheren *Shift*banden; nicht detektierbare Bindung ist mit „n. d.“ gekennzeichnet

Mutante	$K_{\text{ass}}(\text{spez.}) [\text{M}^{-1}]$	$K_{\text{ass}}(\text{unspez.}) [\text{M}^{-1}]$
wt- <i>EcoRI</i>	$2,6 \times 10^9$	$6,8 \times 10^4$
M137C	n. d.	n. d.
M137L	$5,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^4$
M137Q	$8,6 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$
R200K	$2,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^4$
R203K	$2,4 \times 10^8$	$6,7 \times 10^4$
R200K/R203K	$2,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^4$
M137Q/R200K	$2,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$
M137Q/R203K	$8,2 \times 10^7$	$6,2 \times 10^4$
M137Q/R200K/R203K	$6,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^4$

Wie aus Tabelle 3.11 ersichtlich ist, zeigten alle Mutanten eine gegenüber dem Wildtypenzym verminderte spezifische Bindungsfähigkeit. Für die Mutante M137C konnte auch mit diesem Substrat keine Bindung detektiert werden. Die stärkste DNA-Bindung erzielte die Mutante R203K. Dieses war zu erwarten, da sie neben der Mutante M137Q in kinetischen Untersuchungen die höchste Spaltaktivität zeigte. Ansonsten entsprach das Bindungsverhalten der *EcoRI*-Mutanten tendenziell dem zuvor ermittelten Spaltverhalten. Eine Ausnahme bildeten hierbei allerdings die Mutanten M137Q und M137Q/R200K/R203K. Die Mutante M137Q zeigte im Verhältnis zu ihrer hohen Spaltaktivität eine schlechte Bindungsfähigkeit, was bereits von Küster (1998) beobachtet wurde. Die Dreifachmutante M137Q/R200K/R203K, die bei der Spaltung von λ -DNA unter Standardbedingungen eine unspezifische Nukleaseaktivität aufwies, konnte in diesem Test DNA verhältnismäßig stark binden.

Die Bindungskonstanten für die unspezifische Bindung der Mutanten waren erwartungsgemäß etwa um den Faktor 1000 geringer als die für die spezifische Bindung. Für das Wildtypenzym war der Unterschied noch um eine Größenordnung größer.

3.5.3 Bindung an ein Oligonukleotid

Trotz der Bestimmung von Bindungskonstanten mit dem modifizierten Berechnungssystem (siehe 3.5.2) wurden mit allen *EcoRI*-Mutanten zusätzlich Bindungsexperimente mit dem Oligonukleotidpaar B/C, das auch für kinetische Untersuchungen (siehe 2.5.7) eingesetzt wurde, durchgeführt (siehe 2.5.8).

Die Bindung erfolgte hierbei aufgrund der geringeren Menge an radioaktiver Markierung mit der zehnfachen Substratkonzentration (10 nM) bei Raumtemperatur im Bindungspuffer bei pH 7,5. Das Enzym wurde in einem Verhältnis von 20:1 bis 1:1 (Enzym:Substrat) dazugegeben (siehe 2.5.8.2).

In Tabelle 3.12 sind die ermittelten Bindungskonstanten sämtlicher *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym angegeben.

Tab. 3.12: Durch Gelretardation mit dem Oligonukleotidpaar B/C ermittelte Bindungskonstanten K_{ass} der *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum wt-*EcoRI*; nicht detektierbare Bindung ist mit „n. d.“ gekennzeichnet

Mutante	$K_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$
wt- <i>EcoRI</i>	$3,2 \times 10^8$
M137C	n. d.
M137K	$1,6 \times 10^6$
M137L	$3,7 \times 10^6$
M137N	$1,8 \times 10^6$
M137Q	$4,9 \times 10^7$
R200K	n. d.
R203K	$1,8 \times 10^6$
R200K/R203K	n. d.
M137Q/R200K	n. d.
M137Q/R203K	$1,0 \times 10^6$
M137Q/R200K/R203K	$4,4 \times 10^5$
R200Y	n. d.

Mutante	$K_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$
M137Q/R200Y	n. d.
R200Y/R203K	n. d.
M137Q/R200Y/R203K	n. d.
M137A/A138G/A139R	n. d.
M137A/A138G/A139R/R200K	n. d.
M137A/A138G/A139R/R203K	n. d.

Mit diesem *Shift*substrat wurden für alle Mutanten mit Ausnahme der M137Q Bindungskonstanten bestimmt, die mindestens um Faktor 10 von denen abwichen, die mit dem 468 bp langen Substrat ermittelt wurden. Die Bindungsfähigkeit der Mutanten R203K, M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K war sogar um etwa Faktor 100 reduziert und für die Mutanten R200K, R200K/R203K und M137Q/R200K konnte keine Bindung mehr detektiert werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Bindung dieser Mutanten ebenfalls etwa um Faktor 100 reduziert ist und damit unterhalb der Detektionsgrenze von etwa $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ liegt. Auch das Wildtypenzym zeigte eine um eine Zehnerpotenz kleinere Bindungskonstante. Diese verringerte Bindungsfähigkeit der Proteine ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Bindung deutlich von den Seitensequenzen neben der spezifischen Erkennungssequenz abhängt [Jen-Jacobson, 1997]. Diese sind für beide verwendeten Substrate unterschiedlich.

Die ermittelte Bindungskonstante der Mutante M137Q unterschied sich von der zuvor ermittelten nur wenig. Eventuell zeigt sich bei dieser Mutante eine größere Toleranz gegenüber Seitensequenzveränderungen.

Mit der Mutante M137C und den übrigen, in den kinetischen Untersuchungen als inaktive Enzyme ermittelten Mutanten R200Y, M137Q/R200Y, R200Y/R203K, M137Q/R200Y/R203K, M137A/A138G/A139R, M137A/A138G/A139R/R200K und M137A/A138G/A139R/R203K konnte auch mit diesem *Shift*substrat keine Bindung nachgewiesen werden.

3.6 Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutanten mit M137Q auf Substraten mit CpG-Methylierung bzw. CpG-methylierter Erkennungssequenz

Die Einzelmutante M137Q, die als Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Mehrfachmutanten benutzt wurde, zeigte bei Spaltungen mit Oligonukleotiden, die nur in einem Strang an der Position des Cytosins eine Modifikation tragen, eine Bevorzugung von Thymin statt Cytosin bzw. eine Gleichstellung von 5-Methylcytosin und Cytosin [Küster, 1998]. Dieses Ergebnis wurde durch Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten für den jeweiligen radioaktiv markierten Einzelstrang bei konstanter Substratkonzentration ermittelt. Hierbei konnte eine Sättigung des eingesetzten Enzyms durch das Substrat nicht vollständig gewährleistet werden, so daß zur weiteren Charakterisierung Spaltkinetiken nach Michaelis-Menten durchgeführt und daraus resultierende Werte für k_{cat}/K_M verglichen werden mußten. Dafür sind allerdings die verwendeten Oligonukleotide ungeeignet, da sie lediglich in einem Strang modifiziert sind und so je nach Strang unterschiedliche Spaltgeschwindigkeiten aufweisen und einen asymmetrischen Enzym/Substrat-Komplex bilden. Aus diesem Grund wurden neue symmetrische, selbstkomplementäre Oligonukleotide mit der Sequenz ATATAGAATTXTATA (X steht für C, 5mC bzw. T) synthetisiert und von Küster in Michaelis-Menten-Untersuchungen im Vergleich zum Wildtypenzym eingesetzt. Wie an den in Tabelle 3.13 aufgelisteten Werten für die Michaelis-Menten-Parameter k_{cat} und K_M , sowie deren Quotient erkennbar, zeigte die Mutante M137Q eine deutliche Bevorzugung des methylierten Substrats. Damit verhielt sich die Mutante genau gegenteilig zum Wildtypenzym, welches die methylierte Sequenz gegenüber der kanonischen in der gleichen Größenordnung diskriminierte. Die zuvor ermittelte Bevorzugung eines Thymins anstelle des Cytosins in der Erkennungssequenz konnte mit diesen Untersuchungen nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 3.13).

Aufgrund der Ergebnisse zur Präferenz von 5-Methylcytosin durch die Mutante M137Q wurde eine Nutzung des Enzyms für Spaltung von DNA mit natürlich vorkommender Cytosin-Methylierung in Betracht gezogen. 5-Methylcytosin kommt *in vivo* in Eukaryontengenomen vor und ist überwiegend (60 bis 90 %) an CpG-Sequenzen lokalisiert. Somit sind etwa 3 bis 8 % aller vorkommenden Cytosine methyliert [Jeltsch, 2002]. Die Methylierung des Cytosins findet üblicherweise im Anschluß an die Replikation der DNA statt und ist zum Beispiel wichtig für die Genregulation.

Untersuchungen zur Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz wurden sowohl mit entsprechenden Oligonukleotiden (siehe 3.6.1) als auch mit einem eigens dafür entwickelten Plasmid-Testsystem (siehe 3.6.2) durchgeführt. Erläuterungen und Ergebnisse dazu sind im folgenden beschrieben.

3.6.1 Spaltung von Oligonukleotiden mit und ohne CpG-methylierter Erkennungssequenz

Da ein methyliertes Cytosin nur in Sequenzen mit nachfolgendem Guanin vorkommt (CpG), wurden als Testsubstrate Oligonukleotide mit zwei CpG-Sequenzen, an denen das Guanin und Cytosin der Erkennungssequenz beteiligt sind, entworfen. Um einen Vergleich zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz durchführen zu können, wurde ein Oligonukleotidpaar („EcoRI_{meth}“) in methylierter Form mit 5-Methylcytosin an beiden CpG-Sequenzen, das andere („EcoRI“) entsprechend der kanonischen Sequenz unmethyliert synthetisiert. Die Sequenzen dieser nicht selbstkomplementären Oligonukleotide „EcoRI_{meth}“ und „EcoRI“ sind in Tabelle 2.5 angegeben.

Diese zuvor radioaktiv markierten Oligonukleotide (siehe 2.5.7.1) wurden jeweils einzeln in Spaltkinetiken (siehe 2.5.7) mit der Mutante M137Q und dem Wildtypenzym zur Bestimmung von Michaelis-Menten-Parametern eingesetzt. Dazu wurden unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur für bis zu 14 verschiedene Substratkonzentrationen zwischen 25 und 1500 nM Oligonukleotid apparente Geschwindigkeitskonstanten k_{app} (Spaltungen pro Enzymmolekül) ermittelt. Die Enzyme wurden je nach Substratmenge in Konzentrationen von 5, 10, 25 oder 50 nM so eingesetzt, daß die Enzymkonzentration etwa ein Zehntel der Substratkonzentration betrug.

Die so ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden wie unter 2.5.7.2 beschrieben mit einer konstanten Enzymkonzentration in Anfangsgeschwindigkeiten umgerechnet und gegen die Substratkonzentration $c(S)$ aufgetragen, um so die allgemein übliche graphische Darstellung nach Michaelis-Menten (v_0 gegen $c(S)$) bei konstanter Enzymkonzentration zu erhalten. An die Meßpunkte wurde anschließend durch Iteration eine Kurve nach Michaelis-Menten (siehe Formel 2) angepaßt, aus der die Werte für die Parameter K_M und v_{max} resultierten (siehe 2.5.7.2). In den Abbildungen 3.17 bis 3.20 sind die Graphen mit den Meßpunkten, sowie die dazu angepaßten Kurven der theoretisch berechneten Anfangsgeschwindigkeiten für die Spaltung der beiden Oligonukleotide „EcoRI_{meth}“ und „EcoRI“ mit der Mutante M137Q und dem Wildtypenzym gezeigt.

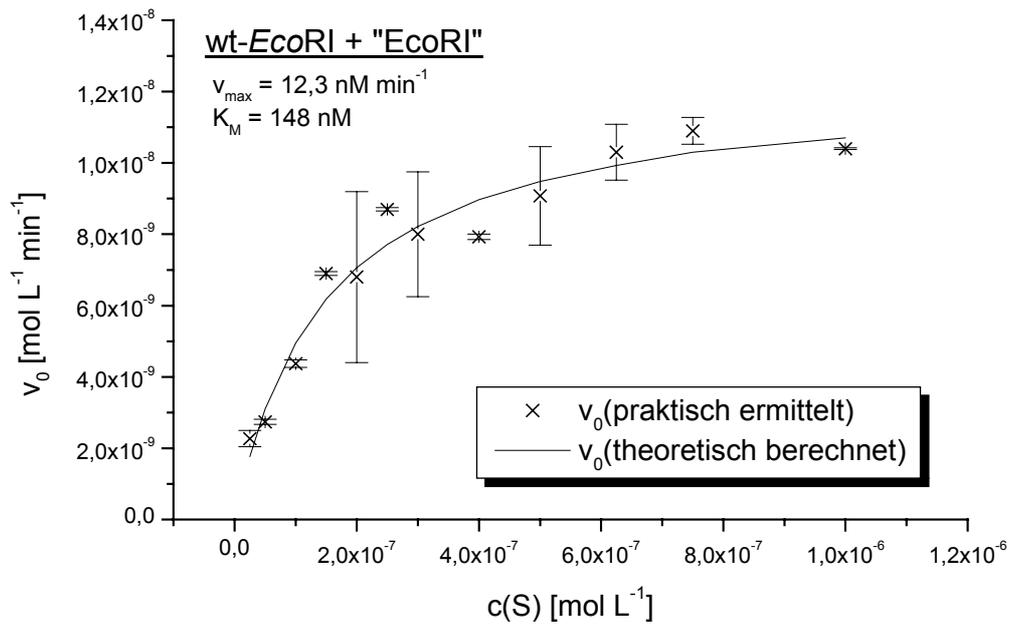


Abb. 3.17: Auswertung der Spaltuntersuchungen des wt-EcoRI mit dem Oligonukleotid „EcoRI“ durch Anpassung einer Kurve nach Michaelis-Menten bei einer konstanten Enzymkonzentration von 5 nM (c(S): Substratkonzentration; v_0 : Reaktionsanfangsgeschwindigkeit)

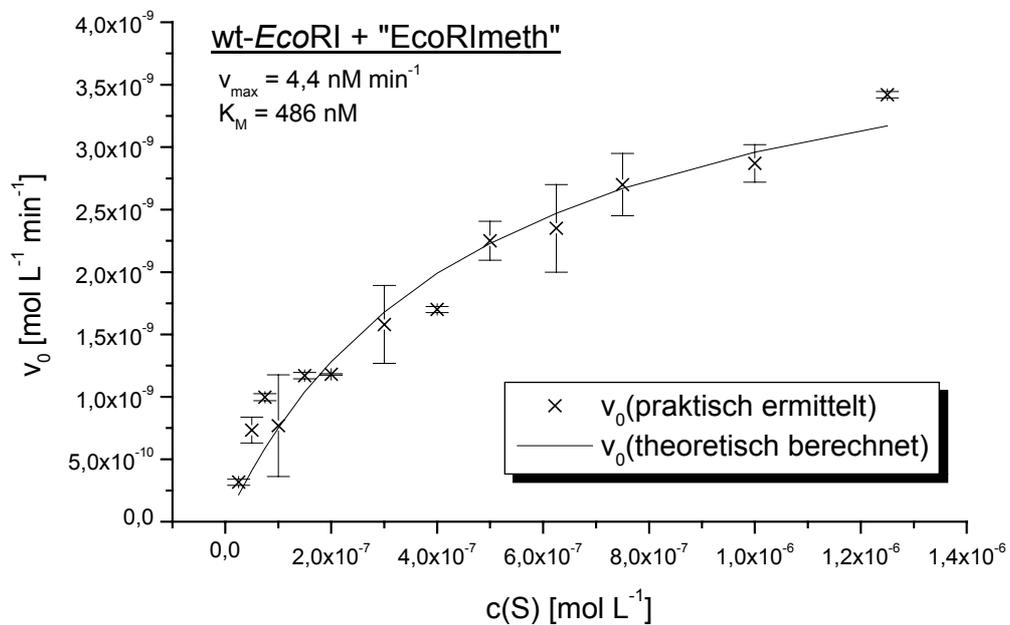


Abb. 3.18: Auswertung der Spaltuntersuchungen des wt-EcoRI mit dem Oligonukleotid „EcoRI meth“ durch Anpassung einer Kurve nach Michaelis-Menten bei einer konstanten Enzymkonzentration von 5 nM (c(S): Substratkonzentration; v_0 : Reaktionsanfangsgeschwindigkeit)

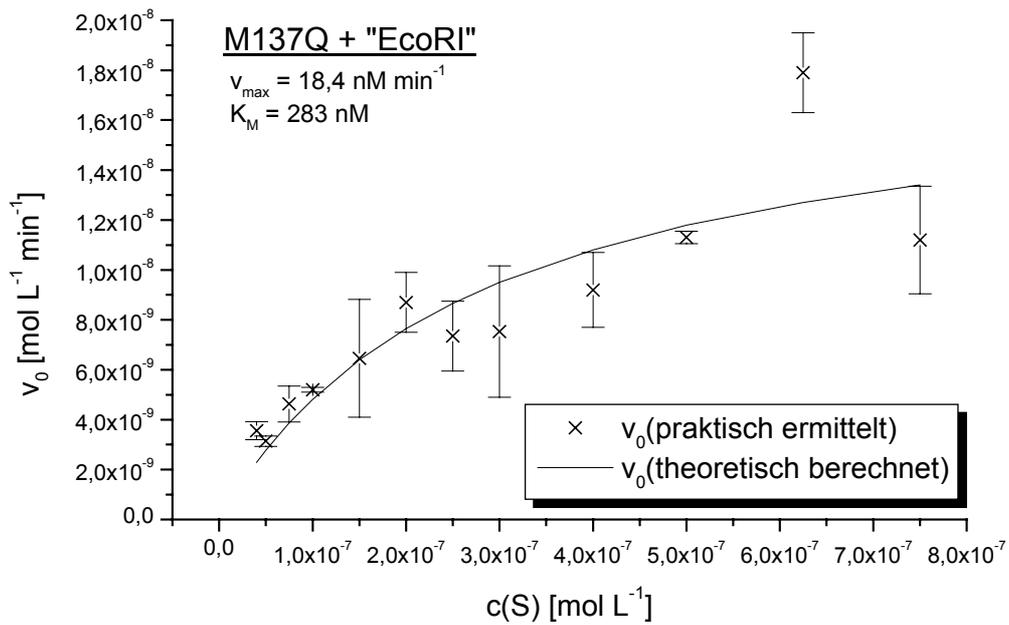


Abb. 3.19: Auswertung der Spaltuntersuchungen der Mutante M137Q mit dem Oligonukleotid „EcoRI“ durch Anpassung einer Kurve nach Michaelis-Menten bei einer konstanten Enzymkonzentration von 5 nM ($c(S)$: Substratkonzentration; v_0 : Reaktionsanfangsgeschwindigkeit)

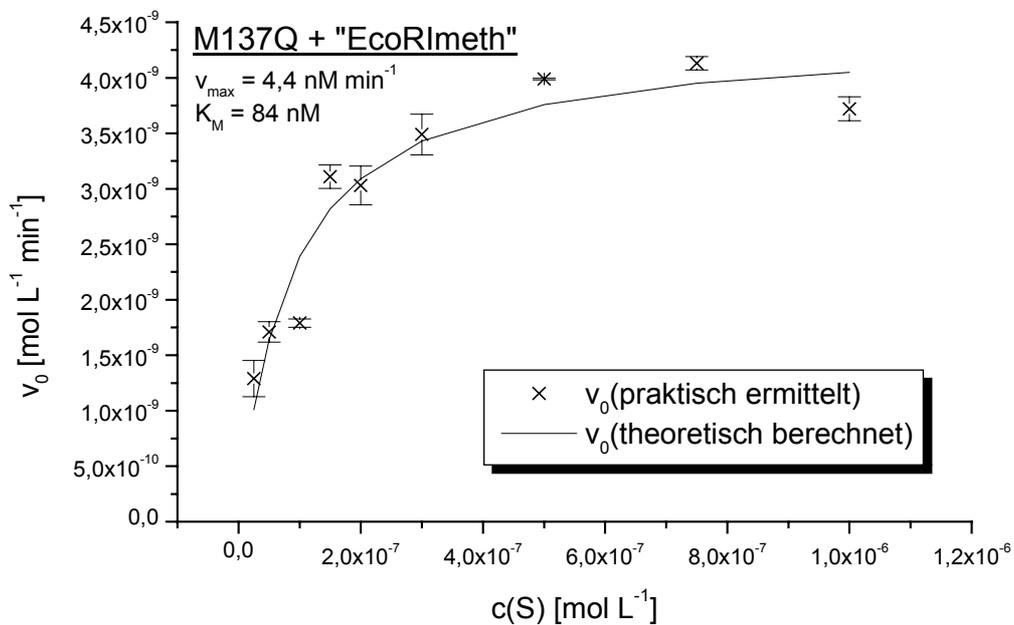


Abb. 3.20: Auswertung der Spaltuntersuchungen der Mutante M137Q mit dem Oligonukleotid „EcoRI meth“ durch Anpassung einer Kurve nach Michaelis-Menten bei einer konstanten Enzymkonzentration von 5 nM ($c(S)$: Substratkonzentration; v_0 : Reaktionsanfangsgeschwindigkeit)

Aus den über die Anpassung ermittelten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{\max} wurden durch Division mit der als konstant gesetzten Enzymkonzentration von 5 nM die Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} berechnet (siehe 2.5.7.2 und Tabelle 3.13).

Wie aus den Abbildungen 3.17 bis 3.20 bzw. der Tabelle 3.13 ersichtlich, spalteten beide Enzyme das unmethylierte Oligonukleotid schneller als das methylierte. Dabei erfolgte die Umsetzung des methylierten Substrats mit gleich hoher Geschwindigkeit, wohingegen das unmethylierte „EcoRI“ von der Mutante M137Q schneller gespalten wurde als vom Wildtypenzym.

Die Affinität des Enzyms zum Substrat ist an der Michaelis-Menten-Konstante K_M erkennbar. Sie steigt mit Verringerung von K_M . Für die Mutante M137Q resultierte aus den Spaltuntersuchungen ein geringerer K_M -Wert für das methylierte Oligonukleotid als für das unmethylierte, woraus in dieser Hinsicht eine Bevorzugung von 5-Methylcytosin gegenüber Cytosin gefolgert werden kann. Für das Wildtypenzym ergab sich genau das Gegenteil.

Neben der gesonderten Betrachtung der zwei Michaelis-Menten-Parameter k_{cat} und K_M ist auch ihr Quotient (k_{cat}/K_M) ein besonderes Charakteristikum für das Enzym/Substrat-System. Je größer dieser Quotient ist, desto optimaler ist das System und sowohl die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat als auch die Reaktionsgeschwindigkeit sind möglichst hoch.

In Tabelle 3.13 sind diese Quotienten, sowie die aus den Kurvenanpassungen resultierenden Werte für die Michaelis-Menten-Parameter k_{cat} und K_M sowohl für die in dieser Arbeit durchgeführten Kinetiken mit den Oligonukleotiden „EcoRI_{meth}“ und „EcoRI“ als auch für die von Küster durchgeführten Untersuchungen mit selbstkomplementären Oligonukleotiden zusammengefaßt.

Tab. 3.13: Michaelis-Menten-Parameter der Spaltung verschiedener Oligonukleotide durch die Mutante M137Q im Vergleich zum wt-*EcoRI*; Werte für die mit * gekennzeichneten Oligonukleotide wurden von Küster ermittelt

Enzym	Oligonukleotid	K_M [mol L ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [L mol ⁻¹ s ⁻¹]
wt- <i>EcoRI</i>	ATATAGAATTCTATA*	$2,0 \times 10^{-7}$	$6,5 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^5$
	ATATAGAATT5mCTATA*	$1,9 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^4$
	ATATAGAATTTTATA*	$4,7 \times 10^{-7}$	$7,5 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^3$
	GATCGAATTCGTGGAC	$1,5 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^5$
	GAT5mCGAATT5mCGTGGAC	$4,9 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^4$
M137Q	ATATAGAATTCTATA*	$2,2 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-1}$	$5,5 \times 10^4$
	ATATAGAATT5mCTATA*	$9,2 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^5$
	ATATAGAATTTTATA*	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,9 \times 10^2$
	GATCGAATTCGTGGAC	$2,8 \times 10^{-7}$	$6,2 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^5$
	GAT5mCGAATT5mCGTGGAC	$8,4 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^5$

Wie an den Werten für die Quotienten k_{cat}/K_M zu erkennen ist, kommt die Bevorzugung von 5-Methylcytosin durch die Mutante M137Q in dem doppelt methylierten Substrat nicht mehr voll zum Tragen. Die unmethylierte Sequenz ist sogar ein leicht besseres Substrat für sie. Trotzdem diskriminiert die Mutante im Gegensatz zum Wildtypenzym kaum gegen eine Methylierung.

Zusätzlich zu den Michaelis-Menten-Parametern wurden für jedes Enzym jeweils zwischen den Spaltungen des kanonischen und des substituierten Substrats die Unterschiede der freien Enthalpien (Gibbs-Energie) $\Delta\Delta G^\ddagger$ bestimmt [Fersht, 1985]. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 3.14 bezogen auf eine Untereinheit bzw. ein katalytisches Zentrum angegeben.

Tab. 3.14: Differenz der freien Enthalpie $\Delta\Delta G^\ddagger$ (Gibbs-Energie) zwischen den Spaltungen des kanonischen und des substituierten Substrats durch die Mutante M137Q im Vergleich zum wt-*EcoRI* bezogen auf ein katalytisches Zentrum; Werte für die mit * gekennzeichneten Oligonukleotide wurden von Küster ermittelt

Oligonukleotid	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (Monomer) [kJ mol ⁻¹]	
	wt- <i>EcoRI</i>	M137Q
ATATAGAATTCTATA*		
ATATAGAATT5mCTATA*	3,2	-2,2
ATATAGAATTTTATA*	6,6	5,3
GATCGAATTCGTGGAC		
GAT5mCGAATT5mCGTGGAC	2,8	0,3

Ist $\Delta\Delta G^\ddagger$ groß, besitzt das Enzym eine deutliche Bevorzugung für das kanonische Substrat gegenüber dem substituierten. Dieses trat für das Wildtypenzym bei allen getesteten Substraten auf. Bei der Mutante M137Q zeigte sich diese deutliche Bevorzugung des kanonischen Substrats nur im Vergleich zu dem mit Thymin substituierten Oligonukleotid.

Ist der Wert für $\Delta\Delta G^\ddagger$ negativ, bevorzugt das Enzym das substituierte (oder modifizierte) Substrat, wie es bei der Mutante M137Q für das einfach methylierte Oligonukleotid der Fall ist. Diese Bevorzugung der Methylierung hebt sich bei Verwendung des doppelt methylierten Substrats auf, was daran zu erkennen ist, daß $\Delta\Delta G^\ddagger$ bei etwa 0 kJ mol⁻¹ liegt. Hier liegt nahezu keine Differenz zwischen den freien Enthalpien der Reaktionen mit dem doppelt methylierten Substrat und dem kanonischen Oligonukleotid mit CG-Sequenzumgebung vor, woraus zu schließen ist, daß das Enzym nicht zwischen den verschiedenen Substraten unterscheiden kann.

Aufgrund der geringen Enzymaktivitäten wurden mit anderen Mutanten, die die Mutation M137Q enthaltenen, die Michaelis-Menten-Untersuchungen nicht durchgeführt. Die Mehrfachmutanten wurden statt dessen mit dem Plasmid-Testsystem (siehe 3.6.2) überprüft.

3.6.2 Untersuchung der Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“

3.6.2.1 Entwicklung des Plasmid-Testsystems „pBR2Eco“

Für die Untersuchung der Diskriminierung zwischen CpG-methylierter und unmethylierter Erkennungssequenz wurde ein Plasmid-Testsystem entwickelt, welches einen direkten Vergleich der beiden Sequenzen durch einmalige Spaltung ermöglicht (siehe 2.5.9). Solch ein Plasmid-Testsystem besitzt gegenüber der Spaltung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden Vorteile, zum Beispiel ist die Durchführung zeitsparender und weniger aufwendig. Der größte Vorteil liegt darin, daß das Testsystem eine natürliche Situation nachstellt, in der die unterschiedlichen Sequenzen durch das nebeneinander Vorliegen auf einem Plasmid direkt in Konkurrenz zueinander stehen und eine eventuelle Präferenz durch das zu untersuchende Enzym direkt ermittelbar ist.

Für dieses Testsystem wurde als Substrat ein Plasmid benötigt, welches zwei *EcoRI*-Spaltstellen mit unterschiedlicher Sequenzumgebung enthält, zum einen die Sequenz CGAATTCG, die durch eine CpG-Methylase vor und in der Erkennungssequenz methyliert wird, und eine sich davon unterscheidende Sequenz, die nicht methyliert werden kann. Da ein derartiges Plasmid nicht vorlag, wurde es neu kloniert (pBR2Eco).

Als Ausgangsvektor für die Generierung von pBR2Eco wurde das Plasmid pBR322 gewählt. Es besitzt eine *EcoRI*-Spaltstelle mit A und T als flankierende Basen. In dieses Plasmid wurde wie unter 2.5.9.1 beschrieben die zusätzliche *EcoRI*-Spaltstelle mit den flankierenden Sequenzen CG kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Spaltstellen einen genügend großen Abstand voneinander aufweisen, damit bei der anschließenden Spaltung Fragmente entstehen, die sich in einem Agarosegel gut trennen lassen.

Um nach den kinetischen Untersuchungen mit *EcoRI*-Proteinen sofort entscheiden zu können, welche der beiden Erkennungssequenzen gespalten wurde, wurde das Plasmid parallel zu der Methylierung mit dem Restriktionsenzym *AlwNI* linearisiert (siehe 2.5.9.2). In Abbildung 3.21 ist das Plasmid pBR2Eco mit den drei Restriktionsspaltstellen unter Angabe der entstehenden Fragmentgrößen dargestellt.

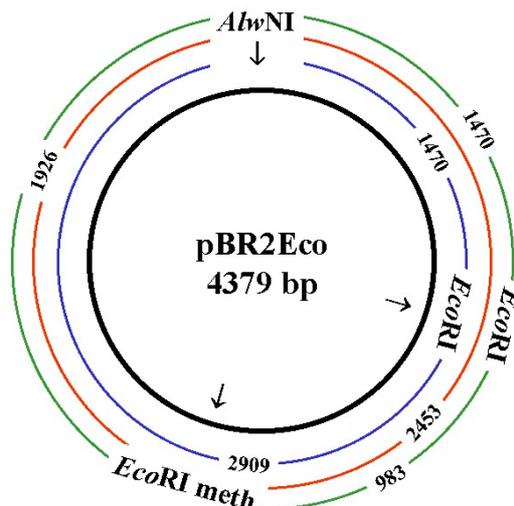


Abb. 3.21: Plasmid pBR2Eco mit Restriktionsspaltstellen für *EcoRI* und *AlwNI* unter Angabe der entstehenden Fragmentgrößen in bp; „*EcoRI* meth“ bezeichnet dabei die methylierbare *EcoRI*-Erkennungssequenz

Bevor das methylierte und linearisierte Plasmid (siehe 2.5.9.2) als Substrat in kinetischen Untersuchungen eingesetzt wird, muß der Grad der Methylierung und die Vollständigkeit der Linearisierung überprüft werden. Dies erfolgte wie unter 2.5.9.3 beschrieben durch Spaltung mit dem gegenüber CpG-Methylierung sensitiven Restriktionsenzym *Psp1406I*, welches seine methylierte Erkennungssequenz nicht mehr spalten kann. Sowohl die Methylierung durch *M.SssI* als auch die Linearisierung durch *AlwNI* waren vollständig, was sich dadurch äußerte, daß nur die Bande des linearisierten Plasmids auf dem Gel zu erkennen war.

3.6.2.2 Anwendung des Plasmid-Testsystems „pBR2Eco“

Nach Modifikation (siehe 2.5.9.2) und Überprüfung des Plasmids pBR2Eco wurde dieses in Spaltuntersuchungen mit den *EcoRI*-Mutanten M137C, M137K, M137L, M137N, M137Q, M137Q/R200K, M137Q/R203K und M137Q/R200K/R203K und dem Wildtypenzym als Vergleich eingesetzt (siehe 2.5.9.3). Dabei fand die Spaltung nur unter Standardbedingungen statt, da die Bevorzugung des 5-Methylcytosins anstelle eines Cytosins in der Erkennungssequenz durch die Mutante M137Q ebenfalls unter diesen Bedingungen ermittelt wurde [Küster, 1998].

Das Wildtypenzym spaltete eindeutig zuerst die unmethylierte Sequenz (siehe Abbildung 3.22). Die Spaltung der methylierten Sequenz konnte in dem untersuchten Zeitraum von 30 Minuten nicht detektiert werden, obwohl die Spaltung der bevorzugten (unmethylierten) Sequenz bereits nach vier Minuten nahezu vollständig war. Dieses Verhalten zeigten die Mutanten M137Q und M137Q/R203K nicht. Zwar spalteten auch sie zunächst die

unmethylierte Sequenz, gingen dann aber sofort zur Spaltung der methylierten Sequenz über. Dies erfolgte im Vergleich zum Verlauf der Kinetik des Wildtypenzym zu einem deutlich früheren Zeitpunkt, zu dem das Wildtypenzym keine Andeutung zur Spaltung der zweiten Sequenz zeigte. In Abbildung 3.22 sind die Kinetiken der drei Enzyme mit dem methylierten Plasmid pBR2Eco dargestellt. Enzymkonzentrationen und Zeiten der Kinetiken wurden so angepaßt, daß vergleichbare Bilder entstehen.

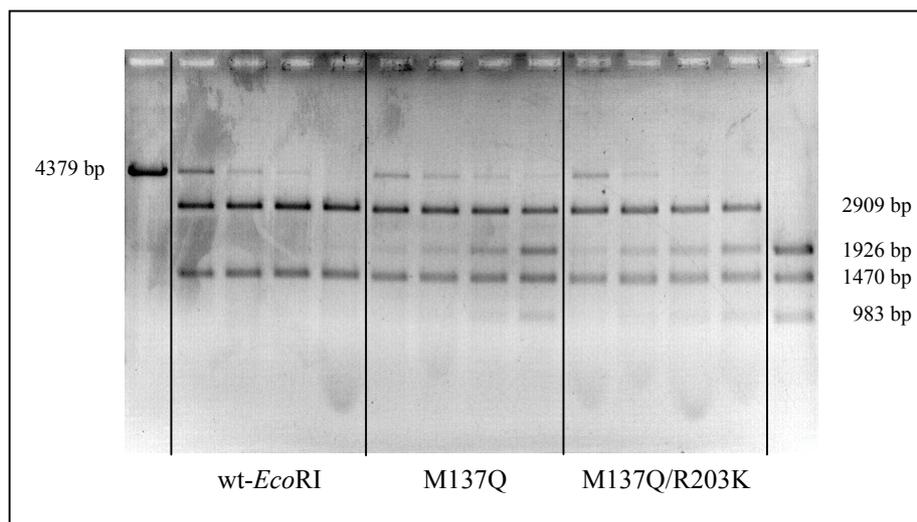


Abb. 3.22: Spaltung des mit *AlwNI* vorlinearisierten und durch *M.SssI* an CpG-Sequenzen methylierten Plasmids pBR2Eco mit den Mutanten M137Q (300 nM) und M137Q/R203K (200 nM) unter Standardbedingungen im Vergleich zum *wt-EcoRI* (100 nM) (Auftrag v. l. n. r.: Standard-linearisiertes Plasmid, Kinetik des *wt-EcoRI* (Zeitwerte 1, 2, 4, 30 min), Kinetik der Mutante M137Q (Zeitwerte 0,5, 1, 2, 4 min), Kinetik der Mutante M137Q/R203K (Zeitwerte 5, 11, 20, 40 min), Standard-Spaltmuster pBR2Eco gespalten mit *EcoRI* und *AlwNI*)

Den Ergebnissen der Kinetiken zufolge können die beiden Mutanten M137Q und M137Q/R203K im Gegensatz zum Wildtypenzym nicht gut zwischen den unterschiedlichen Erkennungssequenzen unterscheiden, wodurch in diesem Sequenzkontext eine Gleichstellung von 5-Methylcytosin und Cytosin durch die Mutanten bestätigt wird.

Zur Kontrolle, inwieweit die Enzyme die beiden Erkennungssequenzen ohne vorherige Methylierung des Plasmids spalten bzw. ob die mit unterschiedlichen Seitensequenzen umgebenen Schnittstellen unterschiedlich schnell gespalten werden und sich bereits daraus eine Präferenz für eine Sequenz ergibt, die nicht in der Methylierung begründet liegt, wurde das Plasmid pBR2Eco ohne Methylierung unter den gleichen Bedingungen von den drei Enzymen *wt-EcoRI*, M137Q und M137Q/R203K gespalten. Wie in Abbildung 3.23 ersichtlich, spalteten alle drei Enzyme beide Erkennungssequenzen ohne sichtbare Bevorzugung gleich schnell.

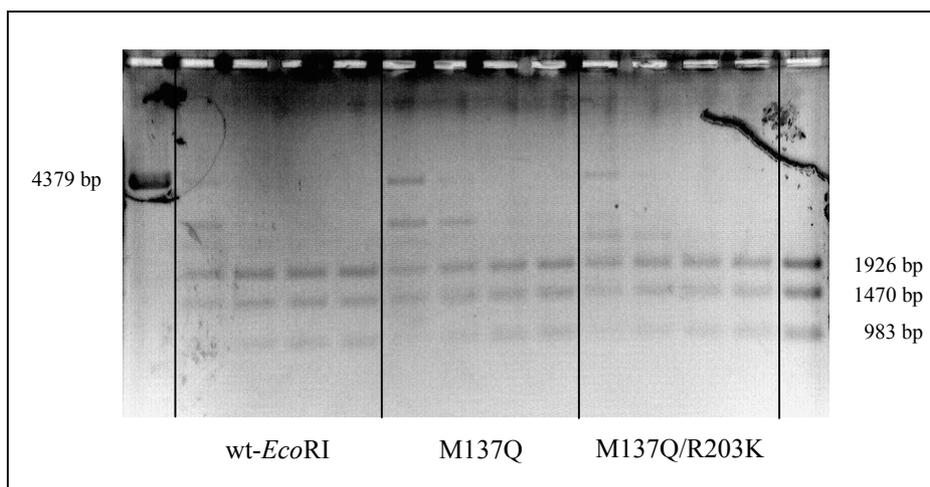


Abb. 3.23: Kontrollspaltung des unmethylierten, mit *AlwNI* vorlinearisierten Plasmids pBR2Eco mit den Mutanten M137Q (300 nM) und M137Q/R203K (200 nM) unter Standardbedingungen im Vergleich zum wt-*EcoRI* (100 nM)
 (Auftrag v. l. n. r.: Standard-linearisiertes Plasmid, Kinetik des wt-*EcoRI* (Zeitwerte 1, 2, 4, 30 min), Kinetik der Mutante M137Q (Zeitwerte 0,5, 1, 2, 4 min), Kinetik der Mutante M137Q/R203K (Zeitwerte 5, 10, 20, 40 min), Standard-Spaltmuster pBR2Eco gespalten mit *EcoRI* und *AlwNI*)

Alle weiteren untersuchten *EcoRI*-Mutanten M137C, M137K, M137L, M137N, M137Q/R200K und M137Q/R200K/R203K spalteten im methylierten Plasmid ebenfalls die unmethylierte Sequenz AGAATTCT zuerst (siehe Abbildung 3.24). Eine Spaltung der methylierten Erkennungssequenz konnte in dem untersuchten Zeitraum außer mit der Mutante M137L nicht detektiert werden. Diese Einzelmutante zeigte eine langsame Spaltung der methylierten Sequenz im Anschluß an die vollständige Spaltung der unmethylierten.

Auch mit diesen Mutanten wurde eine Kontrollspaltung des unmethylierten Plasmids pBR2Eco unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden beide Erkennungssequenzen von den Mutanten mit Ausnahme von M137C und M137K, die sich in bereits durchgeführten kinetischen Untersuchungen als recht inaktiv bzw. langsam erwiesen hatten (siehe 3.4.1), ähnlich schnell gespalten. In Abbildung 3.24 ist dieses Verhalten am Beispiel der Mutanten M137Q/R200K und M137Q/R200K/R203K dargestellt.

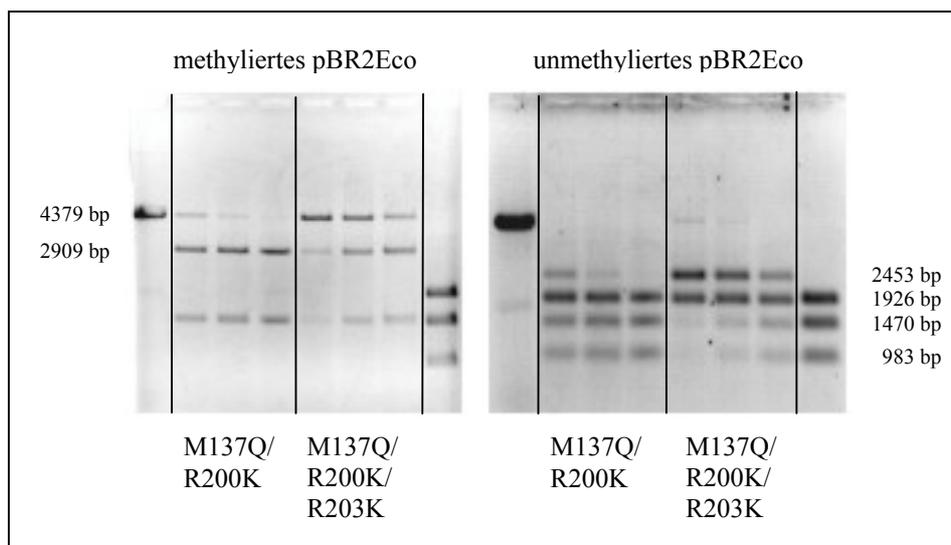


Abb. 3.24: Spaltung des methylierten und unmethylierten, mit *Alw*NI vorlinearisierten Plasmids pBR2Eco mit den Mutanten M137Q/R200K (167 nM) und M137Q/R200K/R203K (210 nM) unter Standardbedingungen (Auftrag jeweils v. l. n. r.: Standard-linearisiertes Plasmid, Kinetik der Mutante M137Q/R200K (Zeitwerte 30, 60, 125 min), Kinetik der Mutante M137Q/R200K/R203K (Zeitwerte 20, 45, 85 min), Standard-Spaltmuster pBR2Eco gespalten mit *Eco*RI und *Alw*NI)

Durch die Untersuchungen mit dem Plasmid-Testsystem zeigte sich, daß der Einfluß der Einzelmutation M137Q in Bezug auf die Bevorzugung von 5-Methylcytosin in Mehrfachmutanten nicht sehr stark zum Tragen kommt. Einzig die Doppelmutante mit R203K besitzt ein vergleichbares Verhalten. In Mutanten mit R200K wird, wie bereits mit weiteren kinetischen Untersuchungen (siehe 3.4.2) ermittelt wurde, der Einfluß sogar so stark geschwächt, daß die Enzyme kaum mehr in der Lage sind, eine methylierte Erkennungssequenz zu spalten.

Die vier in der vorliegenden Arbeit hergestellten Einzelmutanten an der Position Met137 zeigten kein mit der Mutante M137Q vergleichbares Verhalten. Somit behält diese Mutante ihre Sonderstellung und Einzigartigkeit bei.

3.7 Untersuchung des Spaltverhaltens ausgewählter *Eco*RI-Mutanten auf DNA mit *Mun*I-Erkennungssequenz

Die drei *Eco*RI-Mutanten M137A/A138G/A139R, M137A/A138G/A139R/R200K und M137A/A138G/A139R/R203K wurden aufgrund der Homologie zwischen den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Mun*I hergestellt (siehe 3.4.4). Durch die drei, direkt aufeinanderfolgenden Mutationen entspricht ihr *Extended chain*-Motiv (Aminosäuren 137 bis 142) vollständig dem Erkennungsmotiv der Restriktionendonuklease *Mun*I. Bei den bisher durchgeführten Spaltuntersuchungen mit λ -DNA (siehe 3.4.4.1), Plasmiden (siehe 3.4.4.2)

und die kanonische *EcoRI*-Erkennungssequenz enthaltenen Oligonukleotiden (siehe 3.4.4.3) konnte lediglich eine geringe Restaktivität der Mutanten, die sich in einer Anlinearisierung von Plasmiden bzw. einer kaum erkennbaren Spaltung des Oligonukleotids äußerte, festgestellt werden. Die Detektion einer eventuellen Erweiterung oder Änderung der Spezifität zu der Erkennungssequenz von *MunI* (CAATTG) durch Spaltung von λ -DNA war aufgrund der Inaktivität der Mutanten nicht möglich. Da dieses jedoch überprüft werden sollte, wurden die Mutanten mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid „MunI-AT“ (siehe Tabelle 2.5), welches eine *MunI*-Erkennungssequenz zentral enthält, getestet. Bei dieser Methode können wegen der hohen Empfindlichkeit geringste Mengen an gespaltener DNA nachgewiesen werden. Im folgenden sind die Untersuchungen beschrieben.

3.7.1 Spaltung des Oligonukleotids „MunI-AT“

Neben den drei *EcoRI*-Mutanten mit dem *MunI*-Aminosäuresequenzmotiv (siehe 3.4.4) wurden ebenfalls die vier Mutanten mit der Mutation R200Y (R200Y, M137Q/R200Y, R200Y/R203K, M137Q/R200Y/R203K; siehe 3.4.3) mit dem Oligonukleotid „MunI-AT“ (siehe Tabelle 2.5) als Substrat untersucht (siehe 2.5.7), da auch bei diesen nahezu inaktiven Mutanten der Verdacht auf Spezifitätsänderung oder -erweiterung an den äußeren beiden Basen der Erkennungssequenz besteht.

Die Spaltungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid bei Raumtemperatur über Nacht sowohl unter Standard- als auch unter Mangan-Bedingungen für die Mutanten mit R200Y und unter Hochsalz-Bedingungen für die Mutanten mit dem *MunI*-Aminosäuresequenzmotiv (siehe 2.5.5). Die Enzyme wurden jeweils in den höchstmöglichen Konzentrationen eingesetzt. Bei den Untersuchungen war nur von Interesse, ob Spaltung stattfand oder nicht. Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht.

Tatsächlich konnte mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K unter Mangan-Bedingungen eine geringe Spaltung des Oligonukleotids detektiert werden. Unter Standardbedingungen fand diese nicht statt. Zur Kontrolle wurden Spaltungen unter Niedrigsalz- und Hochsalz-Bedingungen durchgeführt, bei denen ebenfalls keine Spaltung beobachtet werden konnte.

Alle anderen untersuchten Mutanten zeigten keinerlei Spaltung des Substrats.

Zusätzlich zur Spaltung des Oligonukleotids „MunI-AT“ wurde die Bindung der Mutante M137Q/R200Y/R203K an das gleiche Oligonukleotid durch *Mobility shift assay* (siehe 2.5.8.2) überprüft. Wie zuvor mit anderen *Shift*substraten (siehe 3.5) konnte auch hier keine Bindung detektiert werden.

3.7.2 Weitere Untersuchungen der Mutante M137Q/R200Y/R203K durch Spaltung des Plasmids pUCMunI

Da mit dem bei Spaltungen von Oligonukleotiden verwendeten Gelsystem (siehe 2.5.7) aufgrund der denaturierenden Bedingungen, unter denen DNA-Doppelstränge auseinander gehen, nicht bestimmt werden kann, ob eine Spaltung in beiden Strängen oder nur ein *Nicking*, die Spaltung nur eines Strangs, stattfindet, sollte die Spaltung mit einem Plasmid, bei dessen anschließender Überprüfung per Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.3.6.1) eine Trennung von durch *Nicking* erzeugter offen zirkulärer und linearisierter DNA möglich ist, verifiziert werden. Da ein derartiges Plasmid, welches eine Schnittstelle für *MunI*, jedoch keine für *EcoRI* besitzt, nicht vorlag, wurde es neu kloniert (pUCMunI).

Im folgenden sind die Klonierung des Plasmids (siehe 3.7.2.1) und die Anwendung in der Spaltung mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K (siehe 3.7.2.2) beschrieben.

3.7.2.1 Darstellung des Substrats pUCMunI

Als Ausgangsvektor für die Generierung von pUCMunI wurde das Plasmid pUC8 ausgewählt. Aus diesem wurde zunächst wie unter 2.3.8 beschrieben durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *PvuII* die Schnittstelle für *EcoRI* entfernt. Anschließend wurde das hybridisierte Oligonukleotidpaar „MunI-AT“ zwischen die Schnittstellen kloniert (siehe 2.3.8). Nach der Selektion positiver Klone wurde das Plasmid durch Sequenzierung (siehe 2.3.9) auf das Vorhandensein der Spaltstelle hin überprüft.

3.7.2.2 Spaltung des Plasmids pUCMunI mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K

Aufgrund der unter Mangan-Bedingungen erzielten Spaltung des Oligonukleotids „MunI-AT“ (siehe 3.7.1) wurde die Spaltung des Plasmids pUCMunI mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K ebenfalls unter diesen Bedingungen (siehe 2.5.5) durchgeführt. Dabei wurde das Enzym erneut in der höchstmöglichen Konzentration eingesetzt und der Ansatz über Nacht inkubiert.

Wie in Abbildung 3.25 erkennbar ist, wurde das Plasmid teilweise gespalten.

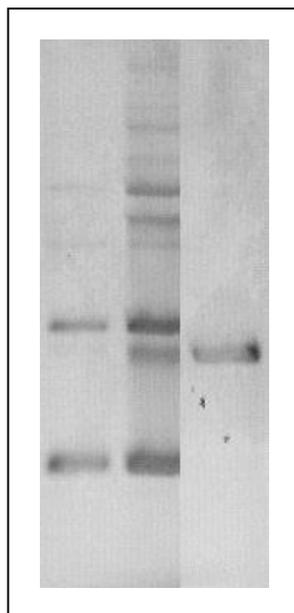


Abb. 3.25: Spaltung des Plasmids pUCMunI mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K (317 nM) unter Mangan-Bedingungen
(Auftrag v. l. n. r.: Standard-natives Plasmid, Spaltung mit der Mutante M137Q/R200Y/R203K (Zeitwert 20 h), Standard-linearisiertes Plasmid)

Die Spaltung wurde mit einer kürzeren Inkubationszeit (8 h) wiederholt. Dabei war der Anteil an gespaltenem Plasmid-DNA geringer als bei langer Inkubationszeit über Nacht. Das zeigt, daß das Enzym über einen längeren Zeitraum aktiv bleibt und die geringe Aktivität durch lange Reaktionszeiten kompensiert werden kann.

Zur Kontrolle der Spaltung an der spezifischen *MunI*-Sequenz CAATTG wurde die Dreifachmutante unter den gleichen Bedingungen wie oben mit einem Plasmid, welches weder eine *EcoRI*- noch eine *MunI*-Schnittstelle enthält, versetzt. Dieses Plasmid, ebenfalls ein Derivat von pUC8, wurde nicht gespalten.

Eine weitere Kontrollspaltung bestand in der Inkubation des Plasmids pUCMunI mit Mangan(II)-chlorid ohne Enzym, um zu überprüfen, ob die zweiwertigen Ionen bei derart langer Inkubationszeit einen Einfluß auf die DNA haben. Auch hierbei ging das Plasmid unverändert aus der Reaktion hervor.

Eine Spaltung von pUCMunI unter Standardbedingungen resultierte in unspezifischem Abbau der DNA, was ebenfalls bereits bei Untersuchungen mit den beiden Plasmiden pRIF309+ und pUC8 beobachtet werden konnte (siehe 3.4.3.2).

Um nachzuweisen, daß tatsächlich die *MunI*-Schnittstelle von der Mutante gespalten wird, wurde das Plasmid pUCMunI vorlinearisiert in der Spaltung eingesetzt. Die Vorlinearisierung wurde mit dem Restriktionsenzym *AlwNI* durchgeführt (siehe 2.3.2), der Spaltansatz über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.3.6.1) und die DNA anschließend aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.1). In der folgenden Spaltung dieses linearisierten Plasmids mit der Mutante

M137Q/R200Y/R203K wurden die gleichen Bedingungen wie zuvor angewandt. Hierbei konnte keine Spaltung detektiert werden. Dieser Sachverhalt scheint darauf hinzuweisen, daß die Mutante superhelikale DNA bevorzugt bzw. benötigt, um spaltaktiv zu sein.

3.7.3 Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutante M137Q/R200Y/R203K auf Oligonukleotiden mit der Sequenz WAATTW (W = A oder T)

Da die Mutante M137Q/R200Y/R203K in der Lage ist, sowohl die Sequenz GAATTC als auch die Sequenz CAATTG zu spalten, bestand der Verdacht, daß für die spezifische Erkennung nur noch die innere AATT-Sequenz und darüber hinaus eine symmetrische Umgebung, wie in den beiden Sequenzen vorhanden, wichtig sind. Aus diesem Grund wurden Spaltuntersuchungen mit zwei Oligonukleotiden V1 und V2 (siehe 2.5.7), die die symmetrische Sequenz AAATTT (V2) bzw. TAATTA (V1) enthalten, durchgeführt (siehe Tabelle 2.5).

Die Spaltungen erfolgten wie unter 3.7.1 mit einer Substratkonzentration von 500 nM Oligonukleotid bei Raumtemperatur unter Mangan-Bedingungen (siehe 2.5.5). Das Enzym wurde in der höchstmöglichen Konzentration eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 6 und 19,5 Stunden.

Für beide Oligonukleotide konnte eine Spaltung detektiert werden. Das bestätigte den Verdacht, daß sich die Erkennung der Mutante wahrscheinlich auf die Vierersequenz AATT beschränkt. Im Vergleich zu der Spaltung mit dem Oligonukleotid „MunI-AT“ (siehe 3.7.1) wurden diese beiden Substrate weniger schnell und zu einem geringeren Teil gespalten. Das bedeutet, daß die Mutante M137Q/R200Y/R203K von den vier symmetrischen Sequenzvariationen um die zentralen AT-Basenpaare die Sequenz CAATTG bevorzugt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationen an der Restriktionsendonuklease *EcoRI* durchgeführt, um zum einen weitere Erkenntnisse über die hydrophoben Wechselwirkungen an der Aminosäureposition 137 zu gewinnen und zum anderen eine Veränderung der Sequenzspezifität in bezug auf das äußere Basenpaar der Erkennungssequenz (GC) zu erreichen, an dessen Bindung Met137 beteiligt ist. Zur Untersuchung des hydrophoben Kontakts wurden vier Einzelmutanten an der Position 137 hergestellt. Für die zweite Aufgabe wurden diverse Enzymvarianten mit Kombinationen geeigneter Aminosäureaustausche generiert.

4.1 Aminosäureaustausche an der Position Met137

An der Position 137 waren bereits eine Reihe von Aminosäureaustauschen durchgeführt worden [Küster, 1998; Ivanenko *et al.*, 1998]. Mit Ausnahme des Austausches gegen Glutamin zeigten alle Mutanten im Verhältnis zum Wildtypenzym einen starken Verlust an katalytischer Aktivität. Diese Ergebnisse bestätigten das Vorhandensein eines hydrophoben Kontakts zwischen Met137 und dem Cytosin der Erkennungssequenz und zeigten außerdem die Wichtigkeit dieses Kontakts für die spezifische DNA-Erkennung. Zur Vertiefung dieser Erkenntnisse wurden vier weitere Einzelmutanten an dieser Position generiert. Darüber hinaus diente die Herstellung zusätzlicher Enzymvarianten neben M137Q der Suche nach potentiellen Ausgangsstrukturen für eine Spezifitätsänderung bzw. -erweiterung durch weitere Mutationen.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurde die unpolare Aminosäure Methionin gegen Asparagin und Cystein, zwei Aminosäuren mit polaren Seitenketten ausgetauscht. Des Weiteren erfolgte die Änderung zum ebenfalls unpolaren Leucin, das in der Lage ist, hydrophobe Wechselwirkungen auszubilden. Für die letzte Modifikation wurde Lysin gewählt, eine große, basische Aminosäure. Alle Mutanten zeigten eine mit dem Wildtypenzym vergleichbare Sekundärstruktur (siehe 3.3). Die katalytische Aktivität wies allerdings einen starken Verlust auf (siehe 3.4.1). So spaltete M137L, die aktivste der vier Mutanten, das Substrat λ -DNA unter Standardbedingungen etwa einen Faktor 500 langsamer als das Wildtypenzym, während die am wenigsten aktive Mutante M137K sogar etwa um einen Faktor 5000 verlangsamt war. Die höchste spezifische Spaltaktivität konnte jeweils unter *Star*-bedingungen mit Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 8,8 erzielt werden, was mit der Beeinflussung der Kopplung zwischen

DNA-Erkennung und Katalyse durch die Pufferbedingungen zusammenhängt. Dieses Verhalten wurde bereits bei anderen inaktiven Mutanten festgestellt [Jeltsch *et al.*, 1993-a; Fritz *et al.*, 1998]. Unter diesen Pufferbedingungen ist die Spezifität des Enzyms dadurch relaxiert, daß nicht alle für die Katalyse erforderlichen spezifischen Kontakte zwischen der DNA und der Restriktionsendonuklease ausgebildet werden müssen, um das katalytische Zentrum zu aktivieren. Man sagt auch, die Stringenz der Kopplung von Erkennung und Katalyse sei reduziert. Daß einige *EcoRI*-Mutanten, die eine Störung im Erkennungsprozeß aufweisen, unter Niedrigsalz-Bedingungen ein kanonisches Spaltpattern zeigen, während sie unter Standardbedingungen inaktiv sind, bestätigt die Interpretation dieses Phänomens der Relaxation der Kopplungsstringenz.

Die Wirkung der genannten *Star*-Bedingungen beruht wahrscheinlich darauf, daß zum einen durch die niedrige Ionenstärke die unspezifische Bindung des Enzyms an die DNA verstärkt wird und zum anderen der alkalische pH-Wert die Bildung von Hydroxyl-Ionen für einen nukleophilen Angriff auf die zu spaltende Phosphodiesterbindung erleichtert. Diese werden durch Abstraktion eines Protons von einem Wassermolekül durch die Phosphatgruppe, welche der zu spaltenden Phosphatgruppe in 3'-Richtung direkt benachbart ist, gebildet.

Zusätzlich zu der erhöhten Aktivität unter Niedrigsalz-Bedingungen trat bei den Mutanten M137L und M137N nach beendeter kanonischer Spaltung auch *Starspaltung* auf. Die Leucin-Mutante zeigte dieses Verhalten sogar unter Hochsalz-Bedingungen, allerdings weniger ausgeprägt bzw. langsamer als unter Niedrigsalz-Bedingungen. Diese Art von Spaltung konnte bisher nur bei M137Q als einziger aus der Reihe der Einzelmutanten an Aminosäureposition 137 beobachtet werden. Bei einer näheren Untersuchung dieses Verhaltens mit Plasmiden als Substrat konnte lediglich festgestellt werden, daß im Gegensatz zum Wildtypenzym jeweils nur eine *Starspaltstelle* (TAATTC) zusätzlich zur kanonischen Sequenz gespalten wurde, was wahrscheinlich mit der verminderten katalytischen Aktivität zusammenhängt (siehe 3.4.1.2).

Für die Mutante M137N bietet sich neben einem Vergleich zum Wildtypenzym auch ein Vergleich zu der herausragenden Mutante M137Q an. Asparagin und Glutamin sind sehr ähnliche Aminosäuren, die sich in ihrem Aufbau lediglich in einer CH₂-Gruppe, um die das Glutamin länger ist, unterscheiden. Es sind ungeladene Aminosäuren mit polarer Seitenkette. Aufgrund der Amidgruppe können Wasserstoffbrückenbindungen sowohl von der Carbonyl- als auch von der Aminogruppe ausgebildet werden. So ist die Mutante M137Q potentiell in der Lage, eine derartige Bindung zur exozyklischen Aminogruppe des Cytosins und zur Carbonylgruppe des benachbarten, äußeren Thymins herzustellen [Küster, 1998]. Dabei ist

die Größe des Aminosäurerestes von Bedeutung, da er nahe genug an die DNA heranreichen muß, um eine Bindung aufzubauen. Dieses scheint bei Glutamin gegeben zu sein, da es eine ähnliche Größe wie das im Wildtypenzym vorhandene Methionin besitzt. Das um eine CH_2 -Gruppe kleinere Asparagin scheint allerdings zu klein zu sein. So ist der Abstand zwischen DNA und Protein zu groß für eine Bindung, durch die unvollständige Erkennung wird die Kopplung zwischen Erkennung und Katalyse gestört und die Spaltaktivität sinkt. Die schlechte spezifische Bindung an DNA mit einer Bindungskonstante, die etwa einen Faktor 10 kleiner als die der Mutante M137Q bzw. etwa einen Faktor 100 kleiner als die des Wildtypenzym ist, bestätigt diese Annahme (siehe 3.5).

Zur besseren Veranschaulichung der räumlichen Struktur und Anordnung der ausgetauschten Aminosäurereste im Protein und ihre Position zur kognaten DNA wurden die untersuchten Aminosäureaustausche mit dem Computerprogramm „Swiss PDB View 3.7“ simuliert. Eine mögliche Konformation der Mutante M137N ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

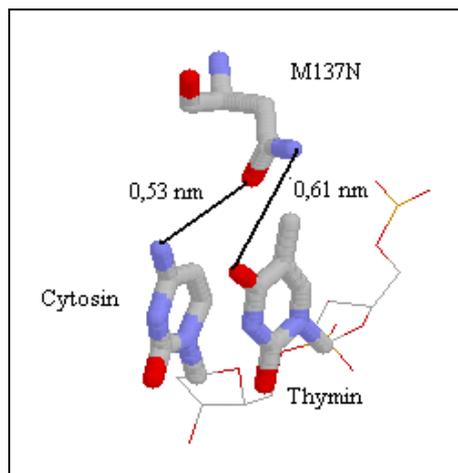


Abb. 4.1: Darstellung des durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „Swiss PDB View“ durchgeführten Aminosäureaustausches von Met137 zu Asparagin unter Aufrechterhaltung der Konformation aller übrigen Aminosäuren des Proteins

Die Computersimulation bestätigt die aus den Untersuchungsergebnissen gefolgerten Interpretationen. Das Asparagin reicht nicht weit genug an die DNA heran, um einen Kontakt zu bilden.

Zusätzlich zu den zwei Wasserstoffbrückenbindungen ist für die Mutante M137Q die Möglichkeit gegeben, zwischen einer Methylengruppe der Seitenkette und einer Methylgruppe am C5 des äußeren Pyrimidins in Form von 5-Methylcytosin bzw. Thymin einen hydrophoben Kontakt aufzubauen [Küster, 1998]. Dieses gilt ebenso für die Mutante M137N. Die Überprüfung der Spaltung von DNA mit durch 5-Methylcytosin anstelle Cytosin substituierter Erkennungssequenz erfolgte mit dem dafür entwickelten Plasmid-Testsystem

„pBR2Eco“ (siehe 3.6.2). Eine Spaltung von methylierter DNA konnte nicht detektiert werden, was gegen einen zusätzlichen hydrophoben Kontakt von M137N spricht. Es ist anzunehmen, daß auch in diesem Fall der Abstand zur DNA nicht für eine Bindung ausreicht bzw. die räumliche Anordnung oder Ausrichtung für einen Kontakt nicht korrekt ist (vergleiche Abbildung 4.1).

Der Austausch von Methionin gegen Leucin war insofern vielversprechend, da es sich bei Leucin auch um eine unpolare Aminosäure handelt, die in der Lage ist, hydrophobe Wechselwirkungen auszubilden. Bei dieser Mutante ist wie bei M137N neben der Abnahme der spezifischen Aktivität auch die DNA-Bindung in derselben Größenordnung beeinträchtigt (siehe 3.5). Den Ergebnissen zufolge ist es dieser Aminosäure nicht möglich, das Methionin zu ersetzen, obwohl sie sich in ihrem Raumbedarf nicht so stark von diesem unterscheidet. Abbildung 4.2 zeigt die Computersimulation dieses Austausches gegen Leucin.

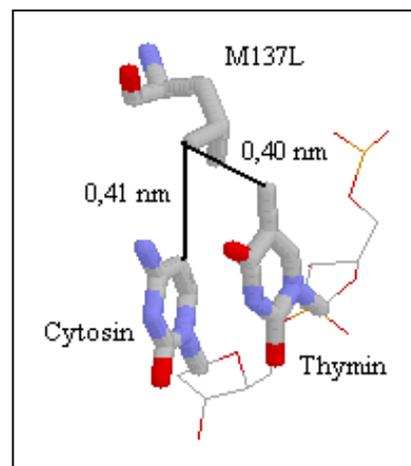


Abb. 4.2: Darstellung des durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „Swiss PDB View“ durchgeführten Aminosäureaustausches von Met137 zu Leucin unter Aufrechterhaltung der Konformation aller übrigen Aminosäuren des Proteins

Die in der Simulation für die Seitenkette des Leucins gewählte räumliche Anordnung ermöglicht prinzipiell aufgrund der geringen Abstände die Ausbildung eines hydrophoben Kontakts sowohl zum H5 des Cytosins als auch zur Methylgruppe des benachbarten Thymins. Hier steht die durchgeführte Computersimulation im Widerspruch mit den gefundenen Untersuchungsergebnissen, was die Grenzen einer solchen Simulation aufzeigt. Bei der Simulation wird nicht die Änderung der Konformation der übrigen im Protein vorhandenen Aminosäuren, die ein Aminosäureaustausch sehr wahrscheinlich mit sich bringt, berücksichtigt. Ähnliches gilt für die DNA. Und auch bei der räumlichen Ausrichtung des ausgetauschten Aminosäurerestes bleibt die starre Struktur der Peptidhauptkette bestehen. So scheint es bei der Mutante M137L eher wahrscheinlich, daß der Aminosäurerest die für einen

hydrophoben Kontakt erforderliche Konformation nicht einnehmen kann, was zusätzlich dadurch bekräftigt werden kann, daß die bereits untersuchte Mutante M137I, mit einem Austausch gegen Isoleucin, vergleichbares Verhalten zeigte [Küster, 1998].

Bei der Spaltung von M137L mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“ zur Überprüfung, ob ein hydrophober Kontakt mit der modifizierten Base 5-Methylcytosin hergestellt werden kann, wurde fast ausschließlich die unmethylierte Erkennungssequenz umgesetzt (siehe 3.6.2). Dies weist wiederum auf das Fehlen eines derartigen Kontakts hin.

Die Mutante M137C zeigte eine kaum detektierbare Spaltaktivität, eine spezifische Bindung an DNA konnte mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Das Cystein ist demnach auch nicht mehr in der Lage, einen Kontakt zur DNA zu bilden. Sein Raumbedarf ist vergleichbar mit dem des Serins, das bereits für einen Austausch verwendet wurde [Küster, 1998], ist allerdings wesentlich kleiner als der des Methionins (siehe auch Abbildung 4.3). Bei der Spaltung mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“ wurde sowohl im methylierten als auch im unmethylierten Zustand des Plasmids nur, und darüber hinaus unvollständig, die Erkennungssequenz mit flankierendem AT gespalten (siehe 3.6.2), was vermutlich in der stark verminderten katalytischen Aktivität der Mutante M137C begründet liegt. Somit läßt sich durch den gewählten Aminosäureaustausch nicht überprüfen, wie wichtig der Schwefel für den hydrophoben Kontakt ist.

Bei der letzten der vier neu hergestellten Einzelmutanten erfolgte der Austausch gegen die große, basische Aminosäure Lysin. Die nahezu vollständige Inaktivität dieser Enzymvariante wird der Strukturbeeinflussung durch den erhöhten Raumbedarf zugeschrieben. In Abbildung 4.3 ist die simulierte Struktur der Mutante gezeigt.

Durch die lange Seitenkette des Lysins könnten je nach räumlicher Anordnung diverse Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, zum Beispiel zum Phosphat zwischen den beiden Thyminen der Erkennungssequenz (GAAT**p**TC). Dies würde einen hydrophoben Kontakt zwischen der Alkylkette des Lysins und der Methylgruppe des äußeren Thymins ermöglichen. Auch eine Ausrichtung weiter ins Innere der DNA wäre denkbar. Dadurch käme die Seitenkette des Lysins dem H5 und H6 des Cytosins recht nahe, so daß ein hydrophober Kontakt aufgebaut werden könnte (siehe Abbildung 4.3).

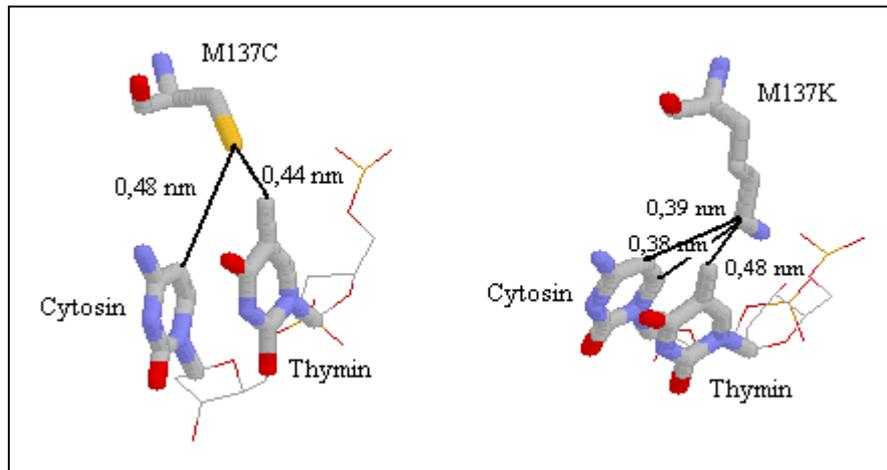


Abb. 4.3: Darstellung der durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „Swiss PDB View“ durchgeführten Aminosäureaustausche von Met137 zu Cystein bzw. Lysin unter Aufrechterhaltung der Konformation aller übrigen Aminosäuren des Proteins

Insgesamt scheint es allerdings aufgrund des erhöhten Raumbedarfs der Lysin-Mutante unmöglich zu sein, eine Bindung zum Cytosin der Erkennungssequenz aufrechtzuerhalten, was in Anbetracht der geringen katalytischen Aktivität im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen steht.

Ein mit M137K vergleichbares Verhalten zeigten die ebenfalls großen Mutanten M137E, M137H, M137R und M137Y [Küster, 1998]. Auffällig an der sauren (E) und den basischen Mutanten (H, K, R) war die stark verlangsamte Spaltung der Spaltstelle B auf λ -DNA (siehe Abbildungen 3.7 und 3.8). Eine Ursache dafür könnte der Einfluß der die Erkennungssequenz flankierenden Basen sein. Auch bei Spaltung des Oligonukleotids B/C wurde für M137K eine 100fach geringere Geschwindigkeitskonstante als für alle anderen getesteten Mutanten ermittelt. Des weiteren spielen vermutlich andere Einflüsse sowohl auf Substratebene, wie zum Beispiel die spezifischen Konformationen des makromolekularen Substrats an den kanonischen Sequenzen, als auch auf Enzymebene, wie zum Beispiel die Dissoziation vom Substrat als geschwindigkeitsbestimmender Schritt, eine Rolle bei der Diskriminierung der Mutante hinsichtlich der Spaltstellen auf λ -DNA. Eine Beeinträchtigung der spezifischen Bindung an DNA um etwa den Faktor 100 im Vergleich zum Wildtypenzym geht konform mit den anderen Ergebnissen zur Spaltaktivität.

Bei den Untersuchungen mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“ wurden die gleichen Beobachtungen gemacht wie mit der Mutante M137C.

Das Verhalten der untersuchten Einzelmutanten spricht eindeutig dafür, daß der hydrophobe Kontakt zwischen Met137 und dem Cytosin der Erkennungssequenz wichtig ist und zur spezifischen Erkennung der DNA beiträgt. Keine der vier neu generierten und biochemisch charakterisierten *EcoRI*-Mutanten zeigte eine mit dem Wildtypenzym vergleichbare

Spaltaktivität oder Ansätze zu veränderter Sequenzspezifität. Somit behält die Mutante M137Q ihre Sonderstellung bei und fand in der vorliegenden Arbeit als einzige aus der Reihe der Einzelmutanten an Position 137 in Mehrfachmutanten Verwendung.

4.1.1 Unteruchung des Spaltverhaltens der Mutante M137Q mit methylierter DNA

Die Mutante M137Q unterscheidet sich von anderen Mutanten an dieser Position durch ihre äußerst hohe spezifische Aktivität und bildet daher eine interessante Ausnahme. Sie ist mindestens so aktiv wie das Wildtypenzym (siehe 3.4.1), obwohl ihre spezifische DNA-Bindung im Vergleich dazu etwas beeinträchtigt ist (siehe 3.5). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, daß die Positionierung des *Extended chain* (Aminosäuren 137 bis 142), von der die meisten Basenkontakte ausgehen, und speziell der benachbarten Aminosäure Ala138 durch den Aminosäureaustausch leicht modifiziert wird. Dabei kann, wie bereits für die Mutante A138V gezeigt wurde [Heitman & Model, 1990-b], die strikte Kopplung von Erkennung und Spaltung gelockert werden. Dies ermöglicht wiederum, daß die schlechtere spezifische Bindung durch leichtere Aktivierung des katalytischen Zentrums kompensiert werden kann.

Da für den Glutaminrest an Position 137 die Möglichkeit gegeben ist, zwischen der β -Methylengruppe der Seitenkette und dem C5 des Cytosins durch eine Modifikation der Base in Form von 5-Methylcytosin einen hydrophoben Kontakt aufzubauen, waren nähere Untersuchungen dieser Mutante mit Oligonukleotiden, in denen eine der Cytosinbasen gegen Uracil, Thymin oder 5-Methylcytosin ausgetauscht war, unternommen worden. Hierbei hatte sich eine Bevorzugung für Thymin gezeigt [Küster, 1998]. Bei der anschließenden Bestimmung von Michaelis-Menten-Parametern, für die andere Oligonukleotide mit Substitutionen in beiden Einzelsträngen verwendet worden waren, zeigte die Mutante M137Q eine deutliche Präferenz für 5-Methylcytosin. Dieses stand genau im Gegensatz zum Wildtypenzym, welches durch die Methylierung am Cytosin aus sterischen Gründen in ähnlicher Größenordnung inhibiert wie die Mutante aktiviert wurde (siehe 3.6 und Tabelle 3.13). Somit schien mit dieser Mutante ein Ausgangspunkt zur Veränderung der Sequenzspezifität gesetzt.

Da 5-Methylcytosin eine in eukaryontischer DNA im Sequenzkontext CpG natürlich vorkommende Base ist, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Spaltung der palindromen um CG erweiterten *EcoRI*-Erkennungssequenz (CGAATTCG) sowohl im unmethylierten als auch im methylierten Zustand mit der Mutante M137Q und dem Wildtypenzym untersucht

(siehe 3.6.1). In dieser zweifach methylierten Sequenz ist die Bevorzugung von 5-Methylcytosin durch die Mutante M137Q nicht mehr vollständig ausgeprägt. Die unmethylierte Sequenz ist sogar ein leicht besseres Substrat für sie. Trotzdem diskriminiert die Mutante im Gegensatz zum Wildtypenzym kaum gegen eine Methylierung. Das ist auch gut an dem Unterschied der freien Enthalpien ($\Delta\Delta G^\ddagger$) der Spaltungen von kanonischem zu substituiertem Substrat zu erkennen, der für das doppelt methylierte Substrat bei etwa 0 kJ mol^{-1} liegt (siehe Tabelle 3.14). Dieses unterschiedliche Verhalten gegenüber dem doppelt und dem einfach methylierten Substrat beruht wahrscheinlich im wesentlichen darauf, daß die Mutante M137Q, wie viele andere auch (Windolph *et al.*, 1997-b), auf Einflüsse der Nachbarsequenzen reagiert. Diese Einflüsse kann das Wildtypenzym erfolgreich kompensieren. Das ist daran zu erkennen, daß jeweils für vergleichbare Substrate (unmethyliert bzw. methyliert) ähnlich große Werte für k_{cat}/K_M ermittelt wurden (siehe Tabelle 3.13).

Ein weiterer Aspekt ist die Strukturbeeinflussung der DNA durch Methylierung am Cytosin. Es konnte gezeigt werden, daß methylierte DNA weniger flexibel als unmethylierte ist und nicht so stark entwunden werden kann [Nathan & Crothers, 2002]. Für die spezifische Erkennung muß *EcoRI* aber gerade an den Phosphodiesterbindungen direkt außerhalb der Sequenz die DNA so knicken, daß sie um fast 30° entwunden wird. Dies könnte um so schwerer sein, je mehr Methylierungen an den direkt angrenzenden Basenpaaren vorhanden sind. Insofern läge eine Benachteiligung des doppelt methylierten Substrats vor, was sich in einer Reduktion der Spaltgeschwindigkeit äußern könnte.

Da durch die mit Oligonukleotiden durchgeführten Einzelspaltungen, bei denen jeweils nur ein Substrat verwendet wurde, die zu spaltenden Sequenzen nicht in Konkurrenz miteinander stehen und so ein direkter Vergleich der Geschwindigkeit ihrer Spaltung erschwert ist, wurde ein Plasmid-Testsystem („pBR2Eco“) entwickelt, welches diesen durch einmalige Spaltung ermöglicht und eine eventuelle Präferenz durch das zu untersuchende Enzym direkt ermittelt (siehe 3.6.2). Auf diesem Plasmid liegt neben der methylierbaren *EcoRI*-Sequenz mit CG-Umgebung eine zusätzliche Sequenz mit AT-Umgebung vor, die nicht methyliert werden kann. Bei der Spaltung des methylierten Plasmids zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Untersuchungen mit den Oligonukleotiden. Die Mutante M137Q machte im Gegensatz zum Wildtypenzym nahezu keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Erkennungssequenzen, wodurch in diesem Sequenzkontext eine Gleichstellung von 5-Methylcytosin und Cytosin bestätigt wurde. Das Wildtypenzym spaltete eindeutig zuerst die unmethylierte Sequenz. Zur Kontrolle, wie stark der Einfluß der die Erkennungssequenzen umgebenden

Basen ist und ob sich bereits durch diesen Unterschied eine Präferenz für eine Sequenz ergibt, die nicht in der Methylierung begründet liegt, wurde auch das unmethylierte Plasmid gespalten. Es ergab sich sowohl für das Wildtypenzym als auch für die Mutante M137Q eine gleich schnelle Spaltung beider Erkennungssequenzen. Somit konnte eine zusätzliche Beeinflussung durch flankierende Sequenzen in diesem Plasmidsubstrat ausgeräumt werden.

Die Mutante M137Q besitzt in höherem Maße als das Wildtypenzym die Fähigkeit, mit 5-Methylcytosin substituierte Sequenzen zu spalten. Diese Fähigkeit ist allerdings noch nicht herausstechend genug für einen Einsatz als methylierungsspezifisches Enzym und wird weiterhin gedämpft von der hohen Spaltaktivität auf unsubstituierten Sequenzen. Aus diesem Grund sollte durch weitere Mutationen versucht werden, die Spaltaktivität auf unsubstituierten Sequenzen zu verringern und gleichzeitig eine nahezu ausschließliche Spaltung von methylierten *EcoRI*-Sequenzen zu erzeugen. Trotz allem ist aber die Bevorzugung von 5-Methylcytosin durch die Mutante M137Q je nach Sequenzkontext eine eindeutige Änderung der Spezifität.

4.2 Mehrfachmutanten zur Änderung der Sequenzspezifität

Die Einzelmutante M137Q wurde nach ausgiebigen Untersuchungen durch zahlreiche Aminosäureaustausche an der Position 137 als am besten geeignete Ausgangsstruktur für weitere Austausche ausgewählt. Sie wurde mit Mutationen an den Positionen 200 und 203 kombiniert, da diese an der Erkennung des GC-Basenpaares ebenfalls beteiligt sind. Dabei kontaktieren Arg200 und Arg203 das Guanin über ein zwischengelagertes Wassermolekül. Außerdem ist Arg203 an einem Phosphatkontakt außerhalb der Erkennungssequenz beteiligt. Aufgrund der genauen Positionierung des Wassermoleküls, über das die Erkennung des Guanins erfolgt, und des daraus resultierenden großen Abstands der Aminosäuren zur DNA war die Auswahl für einen Austausch geeigneter Aminosäuren stark eingeschränkt. Einzig die Aminosäuren Lysin und Tyrosin, das durch die OH-Gruppe auch über Wasserstoffbrückenbindungspotential verfügt, schienen dafür in Frage zu kommen, eine Neuorientierung des Wassermoleküls zu ermöglichen, wobei Tyrosin nur an der Position 200 eingesetzt wurde, da der von der Position 203 gebildete Phosphatkontakt zur DNA aufrechterhalten bleiben sollte, was durch Lysin gewährleistet schien. Darüber hinaus waren schon etliche Punktmutationen an diesen Positionen durchgeführt worden, die alle mit Ausnahme von R203K nur noch geringe oder keine Restaktivität aufzeigten [Alves *et al.*, 1989; Geiger *et al.*, 1989-b;

Oelgeschläger *et al.*, 1990; Heitman & Model, 1990-a]. Eine Spezifitätsänderung war dabei nicht beobachtet worden.

Die Aminosäure Ala138, die über die Carbonylgruppe der Peptidhauptkette in eine Wasserstoffbrückenbindung zur DNA (Cytosin) involviert ist, wurde in dieser Arbeit nicht ausgetauscht und in Mehrfachmutanten berücksichtigt, da die Basenerkennung über das Peptid-NH und nicht über die Seitenkette erfolgt. Eine zielgerichtete Beeinflussung dieses Kontakts wäre nur durch Prolin möglich, das aber die Stellung der direkt folgenden Basenkontakte mit beeinflussen würde. Mutationen an dieser Position zeigten eine Lockerung der Sequenzspezifität. Die Kopplung von Erkennung und Katalyse ist bei ihnen soweit relaxiert, daß die Spaltung schneller erfolgt, auch wenn nicht alle Kontakte hergestellt werden können [Heitman & Model, 1990-b]. Dies könnte sich wie bei der Einzelmutante M137Q positiv auf die Mehrfachmutanten auswirken.

So wurden in der vorliegenden Arbeit Enzymvarianten mit sämtlichen Kombinationen der Mutationen M137Q, R200K, R200Y und R203K hergestellt. Zur Vervollständigung der Charakterisierungen und zum besseren Vergleich der Mutanten untereinander wurden ebenfalls alle Einzelmutanten generiert, auch wenn diese bereits untersucht worden waren. Denn es sollten mit allen Mutanten unter den gleichen Bedingungen gleiche Reaktionen und Tests durchgeführt werden, um einen direkten Vergleich untereinander zu gewährleisten.

Alle hergestellten Mutanten zeigten eine Beeinträchtigung in der spezifischen DNA-Bindung (siehe 3.5), die für die Mutanten mit der R200Y-Mutation so stark war, daß eine Bindung nicht mehr nachzuweisen war. Mit Ausnahme von R203K zeigten alle Mutanten einen starken Verlust an katalytischer Aktivität (siehe 3.4.2 und 3.4.3). Schon die Einzelmutation R200K bewirkte eine so starke Reduktion der Spaltaktivität, daß selbst in Kombination mit den die Kopplung relaxierenden Mutationen M137Q und R203K (siehe auch die Diskussion der Doppelmutante M137Q/R203K) keine gut meßbare Aktivität erzielt werden konnte und der Einfluß der Position 200 überwog. Einzig die Doppelmutante R200K/R203K zeigte eine geringfügig höhere spezifische Aktivität als die Einzelmutante R200K.

Der große Aktivitätsverlust bei Mutanten an der Position 200 kann damit zusammenhängen, daß in dem Protein der Kontakt zwischen den beiden Untereinheiten und damit das Dimerisierungsvermögen gestört ist. Denn Arg200 ist in ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen involviert, daß sich über das *Extended chain*-Motiv und die Helix $\alpha 4$ erstreckt und die Aminosäure Glu144 mit einbezieht, die an der Vernetzung der beiden Proteinuntereinheiten beteiligt ist. Bei einem Austausch dieser Aminosäure könnten somit die Monomer-Monomer-Wechselwirkungen beeinträchtigt sein. Dies scheint bei der Lysin-

Mutante nicht ganz so stark ausgeprägt zu sein, da sie noch eine geringe Restaktivität aufweist und daher wahrscheinlich noch in der Lage ist, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden.

Bei dem Austausch gegen Tyrosin ist diese Störung jedoch ausgeprägter und daran zu bemerken, daß die Mutante im Vergleich zum Wildtypenzym eine Reduktion des α -Helix-Strukturanteils zeigte (siehe 3.3). Solch eine strukturelle Beeinträchtigung war schon bei den Mutanten R200G, R200E und R200Q festgestellt worden, die zu einem geringen Teil als Monomere vorlagen [Geiger *et al.*, 1989-b]. Monomere *EcoRI*-Enzyme können eine unspezifische Nickaseaktivität besitzen [Vennekohl, 1999]. Da mit den die Mutation R200Y enthaltenden Enzymvarianten, die ansonsten nahezu inaktiv waren, unter Mangan-Bedingungen eine unspezifische Nukleaseaktivität auftrat, ist ein Vorhandensein von monomeren Anteilen in diesen Mutanten möglich. Die Mehrfachmutanten mit R200Y wiesen im CD-Spektrum allerdings nur noch eine sehr geringe, im Rahmen der Meßgenauigkeit liegende Abweichung des α -Helix-Strukturanteils auf. Hier wird anscheinend der Einfluß der Einzelmutation R200Y durch die zusätzlichen Mutationen M137Q bzw. R203K kompensiert. Bei allen übrigen *EcoRI*-Mutanten traten im Vergleich zum Wildtypenzym keine signifikanten Unterschiede in der Sekundärstruktur auf (siehe 3.3).

Der Vollständigkeit halber wurden die Mutanten M137Q/R200K und M137Q/R200K/R203K auch mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“ untersucht (siehe 3.6.2). Da bereits bei den anderen kinetischen Tests beobachtet wurde, daß in diesen Enzymvarianten die Mutation R200K den größten Einfluß hat und Wirkungen von anderen Mutationen überdeckt, fiel das Ergebnis wie erwartet aus: Während im methylierten Plasmid nur die unmethylierte Erkennungssequenz gespalten wurde, wurden im unmethylierten Plasmid beide Sequenzen gleich schnell umgesetzt. In diesen Mutanten ist demnach der Einfluß der M137Q vollständig unterdrückt.

In dieser Reihe von Mutanten traten zwei Enzymvarianten aufgrund ihres Spaltverhaltens hervor, zum einen die Mutante R203K, die eine hohe spezifische Aktivität aufwies, und zum anderen die Mutante M137Q/R203K, die eine starke Neigung zu *Starspaltung* zeigte (siehe Tabelle 3.8). Die Einzelmutante R203K spaltete das Substrat λ -DNA unter Standardbedingungen wie erwartet etwa zehnmals langsamer als das Wildtypenzym. Der Lysinrest an dieser Position ist anscheinend noch gut in der Lage, die Positionierung des Wassermoleküls, über das die Basenerkennung erfolgt, in geeigneter Weise durchzuführen. Inwieweit der Phosphatkontakt aufrechterhalten werden kann, ist schwer zu sagen. Es konnte allerdings durch Mutationen an Positionen mit Bindungen zu Phosphaten festgestellt werden, daß dieser Beitrag nicht so kritisch für die Bindung des Enzyms an die DNA zu sein scheint

[Windolph & Alves, 1997-a; Rosati *et al.*, 2002]. Bei der Doppelmutante M137Q/R203K war die Spaltaktivität zwar verringert, allerdings zeigte sie unter allen getesteten Pufferbedingungen *Starspaltung* im Anschluß an die kanonische Spaltung. Dieses Ergebnis zeigte, daß durch die beiden Aminosäureaustausche M137Q und R203K eine Beeinflussung der Kopplung zwischen DNA-Erkennung und Katalyse resultieren muß, die sich in einer potenzierten Relaxation der Kopplungsstringenz äußert, da sie in jeder Einzelmutante nur zu einer Aktivitätssteigerung führt. Es findet also auch dann Spaltung statt, wenn mehr gestört ist als nur die Kontakte zum GC-Basenpaar. In Abbildung 4.4 sind die für die Kopplung bisher als wichtig erkannten Bindungen der Aminosäuren untereinander und zu der zu spaltenden Phosphodiesterbindung dargestellt [Jeltsch *et al.*, 1993-a].

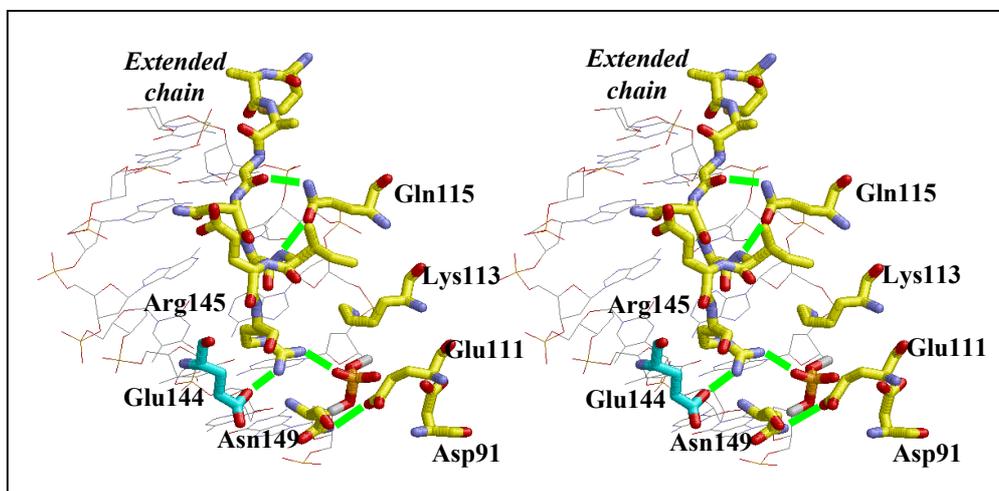


Abb. 4.4: Stereobild der zur Kopplung von Erkennung und Katalyse nötigen proteininternen Kontakte; Glu144 (blau markiert) ist die einzig dargestellte Aminosäure der anderen Untereinheit, sie sorgt für die Verknüpfung der beiden Proteinuntereinheiten; neben den proteininternen Bindungen ist ein Kontakt zu der zu spaltenden Phosphodiesterbindung dargestellt

Wie zu erkennen ist, sind eine Reihe von proteininternen Kontakten vorhanden. So wird zum Beispiel die Stellung des *Extended chain* über zwei Wasserstoffbrückenbindungen an Glu115 weitergeleitet, das im gleichen β -Faltblattstrang lokalisiert ist wie zwei der drei direkt an der Katalyse beteiligten Aminosäuren (Glu111 und Lys113). Darüber hinaus gibt es zusätzliche Bindungen mit bzw. über eingelagerte Wassermoleküle zu anderen Aminosäuren, die nicht alle dargestellt sind, so daß ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen entsteht. Dieses ist recht empfindlich gegenüber Störungen, was sich meistens in einer Reduktion der Spaltaktivität äußert. Die Relaxation der Kopplungsstringenz der Doppelmutante M137Q/R203K könnte nun zum Beispiel dadurch hervorgerufen werden, daß auf der einen Seite zwar das Netzwerk der Bindungen durch den Aminosäureaustausch M137Q im *Extended chain* verändert ist, daß aber trotzdem die Ausrichtung des katalytischen Zentrums,

sowie des Magnesiumions und des angreifenden Wassermoleküls für eine Spaltung möglich ist. Da jedoch die Spaltaktivität der Doppelmutante reduziert ist, scheint die Ausrichtung des katalytischen Zentrums in dieser Konformation beeinträchtigt zu sein.

Aufgrund dieses Verhaltens und der vorhandenen Mutation M137Q wurde die Mutante M137Q/R203K mit dem Plasmid-Testsystem „pBR2Eco“ untersucht (siehe 3.6.2). Sie zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Einzelmutante M137Q. Im Gegensatz zum Wildtypenzym unterschied sie kaum zwischen den beiden Erkennungssequenzen. Die Spaltung der methylierten Sequenz im Vergleich zur unmethylierten erfolgte allerdings auch nicht so schnell wie bei der Mutante M137Q. Demnach wird die Bevorzugung von 5-Methylcytosin durch M137Q durch die zusätzliche Mutation R203K geschwächt, was wiederum mit den oben gemachten Beobachtungen des häufigen Auftretens von *Starspaltung* und der Relaxation der Kopplungsstringenz im Einklang steht. Um den Unterschied zwischen Spaltung von methylierter und unmethylierter DNA näher zu untersuchen, wäre ein Test mit Oligonukleotiden zur Bestimmung von Michaelis-Menten-Parametern, wie er mit der Einzelmutante M137Q und dem Wildtypenzym durchgeführt wurde (siehe 3.6.1), von Nutzen. Dieses konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für diese Mutante nicht mehr durchgeführt werden.

Ein weiterer Grund für die Relaxation der Kopplungsstringenz der Mutante M137Q/R203K könnte in der ungenügenden Positionierung der beiden armähnlichen Strukturen *Inner arm* und *Outer arm* liegen. Met137 schließt sich direkt an den *Inner arm* an, so daß eine Mutation an dieser Position durchaus eine Änderung der räumlichen Anordnung nach sich ziehen könnte. Zwar ist Arg203 mit sechs Aminosäuren zu weit vom *Outer arm* entfernt, als daß ebenfalls eine direkte Änderung resultieren würde, allerdings stehen beide Strukturen so nah beieinander, daß wahrscheinlich eine Konformationsänderung der einen auch eine Änderung der anderen bewirkt.

In diesem Zusammenhang läßt sich ein Vergleich zur verwandten Restriktionsendonuklease *MunI* anstellen. Sie besitzt nicht diese zwei armähnlichen Strukturen, die *EcoRI* dazu benötigt, die DNA für die Erkennung in die erforderliche Konformation zu bringen, obwohl sie sich ansonsten in den Basenkontakten nicht sehr von *EcoRI* unterscheidet. Die Erkennung der inneren Basenpaare (AATT) wird von beiden Enzymen nahezu identisch durchgeführt. Der Kontakt zum CG-Basenpaar erfolgt bei *MunI* durch eine einzelne (Arginin) im Gegensatz zu vier Aminosäuren bei *EcoRI*. Aufgrund dieser Ähnlichkeit bot sich der Versuch an, durch eine Tripelmutation die Spezifität von *EcoRI* zu CAATTG zu ändern (siehe 3.4.4). So wurde durch die entsprechenden Austausch an den Positionen Met137, Ala138 und Ala139 gegen

die Aminosäuren Ala, Gly und Arg das *Extended chain*-Motiv vollständig dem Erkennungsmotiv der *MunI* angeglichen. Diese Mutante zeigte nahezu keine Spaltaktivität mehr, was darauf hindeutet, daß die strukturellen Eingriffe wahrscheinlich zu groß waren, um überhaupt noch eine Funktionalität des Enzyms zu bewahren. Darüber hinaus reichen diese Austausche vor dem Hintergrund der weiteren Strukturunterschiede zwischen *MunI* und *EcoRI* (*MunI* ist durch Deletionen gerade neben den von *EcoRI* zur GC-Erkennung benutzten Aminosäuren ungefähr 70 Aminosäuren kürzer) nicht für eine direkte Spezifitätsänderung aus. Auch die Kombination mit den Mutationen R200K bzw. R203K führte nur zu inaktiven Enzymen. Spezifische DNA-Bindung konnte für keine der drei Mutanten nachgewiesen werden (siehe 3.5).

Da es den Anschein hatte, daß mit der Mutante M137Q/R203K ein weiterer Schritt hin zu einer Änderung der Sequenzspezifität getan war, wurden auch die Kombinationen mit R200K bzw. R200Y näher untersucht. Die Mutante M137Q/R200K/R203K zeigte nahezu keine Spaltaktivität mehr, konnte allerdings unter *Star*bedingungen mit Niedrigsalz und einem pH-Wert von 8,8 zu kanonischer Spaltung aktiviert werden (siehe 3.4.2). In dieser Mutante wird wahrscheinlich der Kontakt zum Guanin durch die Lysine noch zu gut aufrechterhalten, so daß durch relaxierende Pufferbedingungen die kanonische Spaltung beschleunigt wird und in den Vordergrund tritt.

Die andere Dreifachmutante M137Q/R200Y/R203K mit dem Austausch gegen Tyrosin verhielt sich anders. Zwar zeigte auch sie nahezu keine Spaltaktivität mehr, konnte allerdings auch nicht mit *Star*bedingungen zu kanonischer Spaltung aktiviert werden. Lediglich unter Mangan-Bedingungen trat mit λ -DNA als Substrat eine unspezifische Nukleaseaktivität auf (siehe 3.4.3). Zur weiteren Untersuchung der Eigenschaften dieser Mutante wurden Spaltungen mit Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei zeigte sich unter Mangan-Bedingungen eine gut detektierbare Spaltung der Sequenz CAATTG.

Es wurde also durch den zusätzlichen Austausch von Arg200 gegen Tyrosin eine Veränderung der Sequenzspezifität erreicht. Anscheinend ist durch diese Mutation der Kontakt zum Guanin vollständig gelöst, so daß eine von der kanonischen *EcoRI*-Sequenz im äußeren Basenpaar abweichende Sequenz gespalten werden konnte.

Da die Überprüfung der Spaltungen von Oligonukleotiden unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, unter denen nicht bestimmt werden kann, ob eine Spaltung in beiden Strängen oder nur ein *Nicking* stattfindet, wurde die Spaltung der Sequenz CAATTG durch Spaltung des Plasmids pUCMunI, welches eine Schnittstelle für *MunI*, jedoch keine für *EcoRI* besitzt, überprüft (siehe 3.7.2). Die Dreifachmutante M137Q/R200Y/R203K zeigte

eindeutig den Beginn einer Linearisierung des Plasmids. Die Kontrollspaltung mit einer Mutante des Plasmids, welche weder eine *EcoRI*- noch eine *MunI*-Schnittstelle enthält, verlief negativ, wodurch die Spezifitätsänderung zu CAATTG verifiziert wurde.

Da eine Spaltung der ursprünglichen, kanonischen Sequenz GAATTC mit Oligonukleotidsubstraten durch die Mutante nicht vollständig unterdrückt wurde, bestand der Verdacht, daß für die spezifische Erkennung nur noch die inneren Basen AATT und darüber hinaus eine symmetrische Umgebung, wie in den beiden Sequenzen GAATTC und CAATTG vorhanden, wichtig sind. Daher wurden Spaltuntersuchungen mit zwei weiteren Oligonukleotiden, die die symmetrische Sequenz AAATTT bzw. TAATTA enthalten, durchgeführt (siehe 3.7.3). Auch hierbei konnte eine sehr geringe Spaltung detektiert werden, so daß der Nachweis der Spaltung aller vier symmetrischen Sequenzvariationen um die zentralen AT-Basenpaare erbracht war, und den Verdacht bestätigte, daß sich die Erkennung der Mutante wahrscheinlich auf die Vierersequenz AATT beschränkt. Der Vergleich der vier Spaltungen untereinander zeigte allerdings eine deutliche Bevorzugung der Sequenz CAATTG.

Des weiteren gilt zu überlegen, ob ein totaler Verlust der Erkennung der äußeren Basenpaare vorliegt. Dafür scheint das Auftreten von unspezifischer Nukleaseaktivität bei Spaltung von λ -DNA unter Mangan-Bedingungen zu sprechen. Auf diesem großen Substrat sind so viele AATT-Sequenzen, daß keine diskreten Fragmente auf dem analytischen Gel zu sehen sein müßten. Allerdings ist dem die geringe Aktivität der Mutante entgegenzuhalten, die es wohl kaum schafft, alle geeigneten Sequenzen in der vorgegebenen Zeit zu spalten. Die unspezifische Nukleaseaktivität könnte ebensogut durch monomere Anteile hervorgerufen werden (siehe oben). Gegen einen totalen Verlust der Erkennung der äußeren Basenpaare spricht, daß bei der Spaltung der Plasmide nur eine Linearisierung bzw. gar keine Reaktion erfolgte.

Bei der Reaktion mit Plasmiden stellt sich zusätzlich die Frage, ob die Mutante superhelikale DNA bevorzugt bzw. benötigt, um spaltaktiv zu sein. Da mit λ -DNA als Substrat, das nicht in superhelikaler Form vorliegt, außer der unspezifischen Nukleaseaktivität keine Spaltung beobachtet werden konnte und auch vorlinearisierte Plasmid-DNA nicht weiter umgesetzt wurde, scheint dieser Verdacht bestätigt.

Weiter zu beachten ist der Aspekt des Einflusses der Sequenzumgebung. Das Plasmid pUCMunI enthält neben der symmetrischen, sechs Basenpaare umfassenden Sequenz CAATTG nur drei weitere Sequenzen mit AATT in der Mitte, die jedoch nicht symmetrisch sind. Da dieses Plasmid nur linearisiert wurde und das für die Kontrollspaltung benutzte Plasmid, auf dem überhaupt keine AATT-Sequenzen mit symmetrischer Umgebung vorhan-

den sind, gar nicht gespalten wurde, scheint alles darauf hinzuweisen, daß die Symmetrie der Umgebung doch von Wichtigkeit ist, auch wenn nur die inneren AATT-Basenpaare spezifisch erkannt werden. Eventuell wird ein *Nicking* auch an asymmetrischen Sequenzen durchgeführt, wohingegen die Doppelstrangspaltung nur an symmetrischen Sequenzen erfolgen kann.

Weitere Erkenntnisse zu diesen Aspekten können zum Beispiel dadurch gewonnen werden, daß Spaltungen mit Plasmiden durchgeführt werden, die statt der *MunI*-Sequenz die beiden anderen auf Oligonukleotiden getesteten Sequenzen TAATTA und AAATTT beinhalten, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr ausgeführt werden konnte.

Auch wenn noch keine ausschließliche Spaltung einer einzigen Sequenz vorliegt, so ist doch für die Mutante M137Q/R200Y/R203K durch die deutliche Bevorzugung der Sequenz CAATTG eine Veränderung der Spezifität zu verzeichnen.

4.3 Ausblick

In weiterführenden Arbeiten soll die gefundene Spezifitätsänderung der Mutante M137Q/R200Y/R203K manifestiert und ausgebaut werden. Die Spaltung der Sequenz CAATTG muß dabei verbessert werden und in den Vordergrund rücken, während die Spaltung anderer Sequenzen unterdrückt und auf ein Minimum bzw. Null reduziert werden muß. Da eine Vielzahl von Mutagenesestudien zeigten, daß Mutationen der Aminosäuren, die an der spezifischen DNA-Bindung beteiligt sind, nicht allein zu diesem Ziel führen, müssen andere experimentelle Ansätze verfolgt bzw. angewendet werden. Die Grenzen der zielgerichteten Mutagenese sind auch an der Mutante M137Q/R200Y/R203K erkennbar. Während die Doppelmutante M137Q/R203K aufgrund ihrer Relaxation der Kopplungsstringenz sehr vielversprechend für eine Spezifitätsänderung war, bewirkte ihre Kombination mit der einzelnen Mutation R200Y eine drastische Reduktion der Spaltaktivität bis zur nahezu vollständigen Inaktivität. Hier spielen anscheinend größere strukturelle Umordnungen und die Beeinflussung der Kopplung von Erkennung und Katalyse eine Rolle, die eine Stabilisierung neuer Konformationen durch zusätzliche Veränderungen des Enzyms, die nicht direkt die DNA-Bindung betreffen, erfordern [Shimotohno *et al.*, 2001]. Der beste Weg für eine effiziente Verbesserung der Mutante M137Q/R200Y/R203K ist der Einsatz einer *In vitro*-Evolution. Durch Zufallsmutagenese werden dabei auch Bereiche des Proteins verändert, die nicht offensichtlich an der enzymatischen Aktion beteiligt sind. Heutzutage sind mehrere Methoden zur Durchführung einer *In vitro*-Evolution etabliert [Dower & Mattheakis, 2002], unter anderem das *Ribosome display* [Hanes & Plückthun, 1997] und *RNA display* [Roberts &

Szostak, 1997]. Mit solchen Techniken, die natürlich auf die Problemstellung adaptiert werden müssen, besteht die Möglichkeit, die Mutante M137Q/R200Y/R203K in ihren Eigenschaften so zu verbessern, daß ein für den Laboralltag brauchbares Enzym resultiert.

5 Zusammenfassung

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* erkennt hochspezifisch die Basensequenz GAATTC und spaltet diese in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen zwischen dem Guanin und dem Adenin. Die Erkennung erfolgt über ein sehr komplexes und redundantes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen und hydrophoben Kontakten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationen an *EcoRI* durchgeführt mit dem Ziel, eine Veränderung der Sequenzspezifität zu erreichen. Dabei richtete sich das Hauptinteresse auf das äußere Basenpaar der Erkennungssequenz (GC), das von den Aminosäuren Met137, Ala138, Arg200 und Arg203 kontaktiert wird.

Die Mutante M137Q zeigte eine eindeutige Änderung der Spezifität, da sie je nach Sequenzkontext sowohl auf Oligonukleotid- als auch Plasmidsubstraten 5-Methylcytosin bevorzugte. Vier weitere Einzelaminosäureaustausche an der Position Met137 gegen Asparagin, Cystein, Leucin und Lysin zeigten nur geringe Spaltaktivitäten, so daß nur M137Q als Ausgangsstruktur für Mehrfachmutanten verwendet wurde, um die GC-Erkennung zu verändern.

Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit Enzymvarianten mit sämtlichen Kombinationen der Mutationen M137Q, R200K, R200Y und R203K durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt und biochemisch untersucht. Dabei zeigten alle Mutanten mit Ausnahme von R203K und M137Q/R203K einen starken Verlust an spezifischer Aktivität. Insbesondere der Einfluß durch Mutationen an Position 200 war sehr dominant. Die Einzelmutante R203K hingegen war im Vergleich zum Wildtypenzym nur um einen Faktor 10 reduziert. Die Doppelmutation M137Q/R203K bewirkte eine erhöhte Relaxation der Kopplungsstringenz, die sich in der starken Neigung zu *Starspaltung* äußerte und eine Spaltung trotz weiterer Störungen als die in den Kontakten zum GC-Basenpaar erlaubt. Allerdings war bei dieser Mutante die von M137Q ausgehende Bevorzugung von 5-Methylcytosin durch die zusätzliche Mutation R203K geschwächt. Trotzdem schien sie sehr vielversprechend für eine Spezifitätsänderung zu sein.

So zeigte die Kombination von M137Q/R203K mit der Mutation R200Y zwar nahezu keine Spaltaktivität mehr, konnte allerdings unter *Starbedingungen* zu einer Spaltung der Sequenz CAATTG aktiviert werden. Bei der näheren Untersuchung dieser veränderten Spezifität spaltete die Mutante alle vier symmetrischen Sequenzvariationen um die zentralen AT-Basenpaare, allerdings mit einer deutlichen Bevorzugung der Sequenz CAATTG. So ist, auch wenn noch keine ausschließliche Spaltung einer einzigen Sequenz vorliegt, für die Mutante M137Q/R200Y/R203K eine Veränderung der Sequenzspezifität zu verzeichnen.

6 Anhang

Aminosäure- und Basensequenz des Wildtyp-*EcoRI*_{His6}-Enzyms:

1 Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg Leu Thr Glu Gln His Lys Leu Ser Gln
 ATG TCT AAT AAA AAA CAG TCA AAT AGG CTA ACT GAA CAA CAT AAG TTA TCT CAA

 19 Gly Val Ile Gly Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys Ala His Asp Leu Ala Val Gly
 GGT GTA ATT GGG ATT TTT GGG GAT TAT GCA AAA GCT CAT GAT CTC GCT GTT GGT

 37 Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn Glu Tyr Pro Gln Leu Ser
 GAG GTT TCA AAA TTA GTA AAG AAA GCT CTT AGC AAC GAA TAC CCT CAA TTA TCA

 55 Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys
 TTT CGA TAT AGA GAT AGT ATA AAG AAA ACA GAA ATA AAT GAA GCT TTA AAA AAA

 73 Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr Leu Phe Val Ser Asn Ser Ser Ile Lys Pro
 ATT GAC CCT GAT CTT GGC GGT ACT TTA TTT GTT TCA AAT TCC AGC ATC AAA CCT

 91 Asp Gly Gly Ile Val Glu Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu
 GAT GGT GGA ATT GTA GAG GTC AAA GAT GAT TAT GGT GAA TGG AGA GTT GTA CTT

 109 Val Ala Glu Ala Lys His Gln Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu
 GTT GCT GAA GCC AAA CAC CAA GGT AAA GAT ATT ATA AAT ATA AGG AAT GGT TTG

 127 Leu Val Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu
 TTA GTT GGG AAA AGA GGA GAT CAA GAT TTA ATG GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA

 145 Arg Ser His Lys Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser His
 AGA TCT CAT AAG AAT ATA TCA GAG ATA GCG AAT TTT ATG CTC TCT GAG AGC CAC

 163 Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu Asn Ile Ser
 TTT CCT TAC GTC CTT TTC TTA GAG GGG TCT AAC TTT TTA ACA GAA AAT ATC TCA

 181 Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu
 ATA ACA AGA CCA GAT GGA AGG GTT GTT AAT CTT GAG TAT AAT TCT GGT ATA TTA

 199 Asn Arg Leu Asp Arg Leu Thr Ala Ala Asn Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn
 AAT AGG TTA GAT CGA CTA ACT GCA GCT AAT TAT GGA ATG CCT ATA AAT AGT AAT

 217 Leu Cys Ile Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala
 CTA TGT ATT AAC AAA TTT GTA AAT CAT AAA GAC AAA AGC ATT ATG CTA CAA GCA

 235 Ala Ser Ile Tyr Thr Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met Phe
 GCA TCT ATA TAT ACT CAA GGA GAT GGG AGG GAG TGG GAT TCG AAA ATC ATG TTT

 253 Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly Arg Asp Leu
 GAA ATA ATG TTT GAT ATA TCA ACG ACT TCG CTC AGA GTG TTG GGG CGT GAC TTG

 271 Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys His His His His His His ***
 TTT GAA CAG CTT ACT AGT AAG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA

7 Literaturverzeichnis

- Alves, J., Pingoud, A., Langowski, J., Urbanke, C. & Maass, G. (1982); Two identical subunits of the *EcoRI* restriction endonuclease co-operate in the binding and cleavage of the palindromic substrate; *Eur. J. Biochem.* **124**: 139-142
- Alves, J., Pingoud, A., Haupt, W., Langowski, J., Peters, F., Maass, G. & Wolff, C. (1984); The influence of sequences adjacent to the recognition site on the cleavage of oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* endonuclease; *Eur. J. Biochem.* **140**: 83-92
- Alves, J., Rüter, T., Geiger, R., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989-a); Changing the hydrogen-bonding potential in the DNA binding site of *EcoRI* by site-directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, the preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site -GAATTC-; *Biochemistry* **28**: 2678-2684
- Alves, J., Urbanke, C., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989-b); Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* restriction endonuclease; *Biochemistry* **28**: 7879-7888
- Anderson, J.E. (1993); Restriction endonucleases and modification methylases; *Curr. Op. Struct. Biol.* **3**: 24-30
- Arber, W. & Dussoix, D. (1962); Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda; *J. Mol. Biol.* **5**: 18-36
- Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P.A. Wilson, K.S. & Kokkinidis, M. (1994); Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*; *Nature Struct. Biol.* **1**: 469-475
- Ban, C. & Yang, W. (1998); Structural basis for MutH activation in *E.coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases; *EMBO J.* **17**: 1526-1534
- Bickle, T.A. (1993); The ATP-dependent restriction enzymes; in *Nucleases* (Linn, S.M., Lloyd, R.S., Roberts, R.J., Eds; 2nd edition): 89-109, Cold Spring Harbor, New York
- Bickle, T.A. & Krüger, D.H. (1993); Biology of DNA restriction; *Microbiol. Rev.* **57**: 434-450
- Bozic, D., Grazulis, S., Siksnys, V. & Huber, R. (1996); Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr10I* at 2.15Å resolution; *J. Mol. Biol.* **255**: 176-186

- Cheng, X., Balendiran, K., Schildkraut, I. & Anderson, J.E. (1994); Structure of *PvuII* endonuclease with cognate DNA; *EMBO J.* **13**: 3927-3935
- Cheng, X. (1995-a); Structure and function of DNA methyltransferases; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 293-318
- Cheng, X. (1995-b); DNA modification by methyltransferases; *Curr. Op. Struct. Biol.* **5**: 4-10
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H. (1989); One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175
- Connolly, B.A., Eckstein, F. & Pingoud, A. (1984); The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI* catalyzed reaction; *J. Biol. Chem.* **259**: 10760-10763
- Deibert, M., Grazulis, S., Janulaitis, A., Siksnys, V. & Huber, R. (1999); Crystal structure of *MunI* restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.7 Å resolution; *EMBO J.* **18**: 5805-5816
- Deibert, M., Grazulis, S., Sasnauskas, G., Siksnys, V. & Huber, R. (2000); Structure of the tetrameric restriction endonuclease *NgoMIV* in complex with cleaved DNA; *Nature Struct. Biol.* **7**: 792-799
- Drew, H.R., Wing, R.M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. & Dickerson, R.E. (1981); Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2179-2183
- Dryden, D.T.F., Murray, N.E. & Rao, D.N. (2001); Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes; *Nucleic Acids Res.* **29**: 3728-3741
- Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Boyer, H.W. & Goodman, H.M. (1974); Physical identity of the SV40 deoxyribonucleic acid sequence recognized by the *EcoRI* restriction endonuclease and modification methylase; *Biochemistry* **13**: 503-512
- Eggleston, A.K. & West, S.C. (1997); Recombination initiation: easy as A, B, C, D, ... χ ?; *Curr. Biol.* **7**: 745-749
- Ehbrecht, H.-J., Pingoud, A., Urbanke, C., Maass, G. & Gualerzi, C. (1985); Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA; *J. Biol. Chem.* **260**: 6160-6166
- Engel, C. (1993); Proteindesign zur Erweiterung der Substratspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Diplomarbeit, Universität Hannover

- Fersht, A. (1985); *Enzyme structure and mechanism* (2nd edition); Freeman & Co., New York
- Flores, H., Osuna, J., Heitman, J. & Soberón, X. (1995); Saturation mutagenesis of His¹⁴⁴ of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants; *Gene* **157**: 295-301
- Fritz, A. (1991); Herstellung und Charakterisierung der Mutanten N141S, A, D, Y der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Fritz, A. (1994); Protein *Engineering* von Enzymvarianten des *extended chain* Motivs der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Dissertation, Universität Hannover
- Fritz, A., Küster, W. & Alves, J. (1998); Asn¹⁴¹ is essential for DNA recognition by *EcoRI* restriction endonuclease; *FEBS Lett.* **438**: 66-70
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Messing, J. & Shepherd, R.J. (1982); Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *EcoRI**; *DNA* **1** (2): 109-115
- Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A., Wolfes, H., Pingoud, V., Urbanke, C., Maass, G., Pingoud, A., Düsterhöft, A. & Kröger, M. (1989-a); Genetic engineering of *EcoRI* mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site: Physicochemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln144Lys145 and Gln144Lys145Lys200 mutants; *Biochemistry* **28**: 2667-2677
- Geiger, R., Alves, J., Oelgeschläger, T., Rüter, T., Fliess, A. & Pingoud, A. (1989-b); Protein engineering of the *EcoRI* restriction endonuclease; DEHEMA Biotechnology Conferences 3, VCH Verlagsgesellschaft
- Gerschon, D. (2000); Proteindesign zur Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Goodman, H.M., Greene, P.J., Garfin, D.E. & Boyer, H.W. (1977); DNA site recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease and modification methylase; in *Nucleic acid - protein recognition* (Vogel, H.J., Ed.): 239-259, Academic Press, New York
- Grabowski, G. (1993); Charakterisierung des aktiven Zentrums der Restriktionsendonuklease *EcoRI* mithilfe zielgerichtet hergestellter Mutanten; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Grabowski, G., Jeltsch, A., Wolfes, H., Maass, G. & Alves, J. (1995); Site-directed mutagenesis in the catalytic center of the restriction endonuclease *EcoRI*; *Gene* **157**: 113-118
- Grazulis, S., Deibert, M., Rimseliene, R., Skirgaila, R., Sasnauskas, G., Lagunavicius, A., Repin, V., Urbanke, C., Huber, R. & Siksnys, V. (2002); Crystal structure of the *Bse634I*

- restriction endonuclease: comparison of two enzymes recognizing the same DNA sequence; *Nucleic Acids Res.* **30**: 876-885
- Greene, P.J., Gupta, M., Boyer, H.W., Brown, W.E. & Rosenberg, J.M. (1981); Sequence analysis of the DNA encoding the *EcoRI* endonuclease and methylase; *J. Biol. Chem.* **256**: 2143-2153
- Halford, S.E., Johnson, N.P. & Grinstead, J. (1980); The *EcoRI* restriction endonuclease with bacteriophage lambda DNA. Kinetic studies; *Biochem. J.* **191**: 581-592
- Hanahan, D. (1983); Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanes, J. & Plückthun, A. (1997); *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 4937-4942
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1972); DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 3448-3452
- Heitman, J. & Model, P. (1990-a); Substrate recognition by the *EcoRI* endonuclease; *Proteins* **7**: 185-197
- Heitman, J. & Model, P. (1990-b); Mutants of the *EcoRI* endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition; *EMBO J.* **9**: 3369-3378
- Heitman, J. (1992); How the *EcoRI* endonuclease recognize and cleaves DNA; *BioEssays* **14**: 445-454
- Heitman, J. (1993); On the origins, structures and functions of restriction-modification enzymes; in *Genetic engineering* (Setlow, J.K., Ed.): 57-108, Plenum Press, New York
- Hickman, A.B., Li, Y., Mathew, S.V., May, E.W., Craig, N.L. & Dyda, F. (2000); Unexpected structural diversity in DNA recombination: the restriction endonuclease connection; *Mol. Cell* **5**: 1025-1034
- Hochuli, E. (1990); Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbent; *Genetic Engineering* **12**: 87-98
- Hsu, M. & Berg, P. (1978); Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing Mg^{2+} with Mn^{2+} ; *Biochemistry* **17**: 131-138

-
- Huai, Q., Colandene, J.D., Chen, Y., Luo, F., Zhao, Y., Topal, M.D. & Ke, H. (2000); Crystal structure of *NaeI*-an evolutionary bridge between DNA endonuclease and topoisomerase; *EMBO J.* **19**: 3110-3118
- Ivanenko, T., Heitman, J. & Kiss, A. (1998); Mutational analysis of the function of Met137 and Ile197, two amino acids implicated in sequence-specific DNA recognition by the *EcoRI* endonuclease; *Biol. Chem.* **379**: 459-465
- Jeltsch, A., Alves, J., Maass, G. & Pingoud, A. (1992); On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*; *FEBS Lett.* **304**: 4-8
- Jeltsch, A., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993-a); Mutational analysis of the function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis; *J. Mol. Biol.* **229**: 221-234
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993-b); Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8499-8503
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1994); Pausing of the restriction endonuclease *EcoRI* during linear diffusion on DNA; *Biochemistry* **33**: 10215-10219
- Jeltsch, A., Alves, J., Urbanke, C., Maass, G., Eckstein, H., Lianshan, Z., Bayer, E. & Pingoud, A. (1995); A dodecapeptide comprising the extended chain- α 4 region of the restriction endonuclease *EcoRI* specifically binds to the *EcoRI* recognition site; *J. Biol. Chem.* **270**: 5122-5129
- Jeltsch, A. (2002); Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases; *ChemBioChem* **3**: 274-293
- Jen-Jacobson, L., Engler, L.E., Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R., Yee, C. & McVerry, B. (1996); Structural adaptations in the interaction of *EcoRI* endonuclease with methylated GAATTC sites; *EMBO J.* **15**: 2870-2882
- Jen-Jacobson, L. (1997); Protein-DNA recognition complexes: Conservation of structure and binding energy in the transition state; *Biopolymers* **44**: 153-180
- Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J. & Rosenberg, J.M. (1990); Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing; *Science* **249**: 13307-13309

- King, K., Benkovic, S.J. & Modrich, P. (1989); Glu-111 is required for activation of the DNA cleavage center of *EcoRI* endonuclease; *J. Biol. Chem.* **264**: 11807-11815
- Kostrewa, D. & Winkler, F.K. (1995); Mg²⁺ binding to the active site of *EcoRV* endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2Å resolution; *Biochemistry* **34**: 683-696
- Kovall, R.A. & Matthews, B.W. (1998); Structural, functional, and evolutionary relationships between λ-exonuclease and the type II restriction endonucleases; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7893-7897
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., Pflugfelder, M. & Fritz, H.J. (1984); The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction; *Nucleic Acids Res.* **12**: 9441-9456
- Küster, W. (1998); Bedeutung hydrophober Kontakte für die sequenzspezifische DNA-Erkennung der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Dissertation, Universität Hannover
- Laemmli, U.K. (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* **227**: 680-685
- Lagunavicius, A. & Siksnys, V. (1997); Site-directed mutagenesis of putative active site residues of *MunI* restriction endonuclease: replacement of catalytically essential carboxylate residues triggers DNA binding specificity; *Biochemistry* **36**: 11086-11092
- Langowski, J., Pingoud, A., Goppelt, M. & Maass, G. (1980); Inhibition of *EcoRI* action by polynucleotides. A characterization of the nonspecific binding of the enzyme to DNA; *Nucleic Acids Res.* **8**: 4727-4736
- Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R. & Jen-Jacobson, L. (1990); The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction; *Science* **250**: 776-786
- Lukacs, C.M., Kucera, R., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (2000); Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of *BglII* and its DNA substrate at 1.5 Å resolution; *Nature Struct. Biol.* **7**: 134-140
- Lukacs, C.M. & Aggarwal, A.K. (2001); *BglII* and *MunI*: what a difference a base makes; *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**: 14-18
- Luke, P.A. & Halford, S.E. (1985); Solubility of the *EcoRI* restriction endonuclease and its purification from an over-producing strain; *Gene* **37**: 241-246

- Luria, S.E. & Human, M.L. (1952); A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses; *J. Bacteriol.* **64**: 557-569
- Malyguine, E., Vannier, P. & Yot, P. (1980); Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents; *Gene* **8**: 163-177
- McClarín, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J. & Rosenberg, J.M. (1986); Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3Å resolution; *Science* **234**: 1526-1541
- McClelland, M., Nelson, M. & Raschke, E. (1994); Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases; *Nucleic Acids Res.* **22**: 3640-3659
- Meisel, A., Bickle, T.A., Krüger, D.H. & Schroeder, C. (1992); Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage; *Nature* **355**: 467-469
- Meisel, A., Mackeldanz, P., Bickle, T.A., Krüger, D.H. & Schroeder, C. (1995); Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis; *EMBO J.* **14**: 2958-2966
- Modrich, P. & Zabel, D. (1976); *EcoRI* endonuclease, physical and catalytic properties of the homogenous enzyme; *J. Biol. Chem.* **251**: 5866-5874
- Nathan, D. & Crothers, D.M. (2002); Bending and flexibility of methylated and unmethylated *EcoRI* DNA; *J. Mol. Biol.* **316**: 7-17
- Needels, M.C., Fried, S.R., Love, R., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1989); Determinants of *EcoRI* endonuclease sequence discrimination; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3579-3583
- Newman, A.K., Rubin, R.A., Kim, S.-H. & Modrich, P. (1981); DNA sequences of structural genes for *EcoRI* DNA restriction and modification enzymes; *J. Biol. Chem.* **256**: 2131-2139
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L.F., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1994); Structure of restriction endonuclease *BamHI* and its relationship to *EcoRI*; *Nature* **368**: 660-664
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1995); Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding; *Science* **269**: 656-663

- Newman, M., Lunnen, K., Wilson, G., Greci, J., Schildkraut, I. & Phillips, E.V. (1998); Crystal structure of restriction endonuclease *BglI* bound to its interrupted DNA recognition sequence; *EMBO J.* **17**: 5466-5476
- Oelgeschläger, T., Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A. & Pingoud, A. (1990); Probing the function of individual amino acid residues in the DNA binding site of the *EcoRI* restriction endonuclease by analysing the toxicity of genetically engineered mutants; *Gene* **89**: 19-27
- Oelgeschläger, T. (1992); Protein-Engineering an der Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Konstruktion von Enzymvarianten mit erweiterter Substratspezifität; Dissertation, Universität Hannover
- Osuna, J., Flores, H. & Soberón, X. (1991); Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities; *Gene* **106**: 7-12
- Pingoud, A. (1985); Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. Suppression of cleavage at degenerate, non-symmetrical sites; *Eur. J. Biochem* **147**: 105-109
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (1997); Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases; *Eur. J. Biochem.* **246**: 1-22
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (2001); Structure and function of type II restriction endonucleases; *Nucleic Acids Res.* **29**: 3705-3727
- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1975); Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3310-3314
- Rinkel, L.J., Van der Marel, G.A., Van Boom, J.H. & Altona, C. (1987); Influence of N6-methylation of residue A(5) on the conformational behaviour of d(C-C-G-A-A-T-T-C-G-G) in solution studied by ¹H-NMR spectroscopy, 1. The duplex form; *Eur. J. Biochem.* **163**: 275-286
- Roberts, R.J. & Halford, S.E. (1993); Type II restriction endonucleases; in *Nucleases* (Linn, S.M., Lloyd, R.S., Roberts, R.J., Eds; 2nd edition): 35-88, Cold Spring Harbor, New York
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J. & Macelis, D. (2003-a); REBASE: restriction enzymes and methyltransferases; *Nucleic Acids Res.* **31**: 418-420

- Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S.Kh., Dryden, D.T.F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E.S., Gumport, R.I., Halford, S.E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D.P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T.R., Kobayashi, I., Kong, H., Krueger, D.H., Lacks, S., Marinus, M.G., Miyahara, M., Morgan, R.D., Murray, N.E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D.N., Reich, N., Repin, V.E., Selker, E.U., Shaw, P.-C., Stein, D.C., Stoddard, B.L., Szybalski, W., Trautner, T.A., Van Etten, J.L., Vitor, J.M.B., Wilson, G.G. & Xu, S.-y. (2003-b); A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes; *Nucleic Acids Res.* **31**: 1805-1812
- Roberts, R.W. & Szostak, J.W. (1997); RNA-peptide fusions for the *In vitro* selection of peptides and proteins; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12297-12302
- Rosati, O. (1999); Untersuchung und Design von DNA-Kontakten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* inner- und außerhalb der Erkennungssequenz; Dissertation, Universität Hannover
- Rosati, O., Srivastava, T.K., Katti, S.B. & Alves, J. (2002); Importance of phosphate contacts for sequence recognition by *EcoRI* restriction enzyme; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 198-205
- Rosenberg, J.M. & Greene, P. (1982); *EcoRI** specificity and hydrogen bonding; *DNA* **1**: 117-124
- Rosenberg, J.M. (1991); Structure and function of restriction endonucleases; *Curr. Op. Struct. Biol.* **1**: 104-113
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I. & Banaszak, L.J. (1975); Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases; in *The Enzymes* (Boyer, P., Ed.): 61-102
- Rotzal, L.-U. (1992); Molekulare Konstruktion, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung des *EcoRI*_{His6} Fusionsproteins; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001); *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edition); Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F. & Pingoud, A. (1992); A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *EcoRV*; *Biochemistry* **31**: 4808-4815

- Shimotohno, A., Oue, S., Yano, T., Kuramitsu, S. & Kagamiyama, H. (2001); Demonstration of the importance and usefulness of manipulating non-active-site residues in protein design; *J. Biochem.* **129**: 943-948
- Siksnys, V. & Pleckaityte, M. (1993); Catalytic and binding properties of restriction endonuclease *Cfr9I*; *Eur. J. Biochem.* **217**: 411-419
- Siksnys, V., Zareckaja, N., Vaisvila, R., Timinskas, A., Stakenas, P., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1994); CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from Mycoplasma: sequence similarities between R·*MunI* and R·*EcoRI*; *Gene* **142**: 1-8
- Siksnys, V., Timinskas, A., Klimasauskas, S., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1995); Sequence similarity among type-II restriction endonucleases, related by their recognized 6-bp target and tetranucleotide-overhang cleavage; *Gene* **157**: 311-314
- Skirgaila, R., Grazulis, S., Bozic, D., Huber, R. & Siksnys, V. (1998); Structure-based redesign of the catalytic/metal binding site of *Cfr10I* restriction endonuclease reveals importance of spatial rather than sequence conservation of active centre residues; *J. Mol. Biol.* **279**: 473-481
- Smith, H.O. & Nathans, D. (1973); A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes; *J. Mol. Biol.* **81**: 419-423
- Sreerama, N. & Woody, R.W. (2000); Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set; *Anal. Biochem.* **287**: 252-260
- Stewart, F.J., Panne, D., Bickle, T.A. & Raleigh, E.A. (2000); Methyl-specific DNA binding by McrBC, a modification-dependent restriction enzyme; *J. Mol. Biol.* **298**: 611-622
- Szybalski, W., Kim, S.C., Hasan, N. & Podhajaska, A.J. (1991); Class-IIS restriction enzymes- a review; *Gene* **100**: 13-26
- Taylor, J.D., Goodall, A.J., Vermote, C.L.M. & Halford, S.E. (1990); Fidelity of DNA recognition by the *EcoRV* restriction/modification system *in vivo*; *Biochemistry* **29**: 10727-10733
- Terry, B.J., Jack, W.E. & Modrich, P. (1985); Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease: nonspecific interactions in *EcoRI* catalysis; *J. Biol. Chem.* **260**: 13130-13137

- Thielking, V., Alves, J., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1990); Accuracy of the *EcoRI* restriction endonuclease: binding and cleavage studies with oligodeoxynucleotide substrates containing degenerate recognition sequences; *Biochemistry* **29**: 4682-4691
- Thomas, M. & Davis, R.W. (1975); Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *EcoRI* restriction endonuclease; *J. Mol. Biol.* **91**: 315-328
- Titheradge, A.J.B., King, J., Ryu, J. & Murray, N.E. (2001); Families of restriction enzymes: an analysis prompted by molecular and genetic data for type II restriction and modification systems; *Nucleic Acids Res.* **29**: 4195-4205
- Van Cleve, M.D. & Gumport, R.I. (1992); Influence of enzyme-substrate contacts located outside the *EcoRI* recognition site on cleavage of duplex oligodeoxyribonucleotide substrates by *EcoRI* endonuclease; *Biochemistry* **31**: 334-339
- van der Woerd, M.J., Pelletier, J.J., Xu, S. & Friedman, A.M. (2001); Restriction Enzyme BsoBI-DNA Complex: A Tunnel for Recognition of Degenerate DNA Sequences and Potential Histidine Catalysis; *Structure* **9**: 133-144
- Vennekohl, P. (1996); Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Stabilisierung der dimeren Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Vennekohl, P. (1999); Bedeutung der Dimerisierung für Spezifität und Katalyse der Restriktionsendonuklease *EcoRI*; Dissertation, Universität Hannover
- Vipond, I.B. & Halford, S.E. (1995); Specific DNA recognition by *EcoRV* restriction endonuclease induced by calcium ions; *Biochemistry* **34**: 1113-1119
- von Witzendorff, D. (2002); Fusion von DNA-Bindungsdomänen mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* zur Erweiterung der Sequenzspezifität; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1997); Structure of the multimodular endonuclease *FokI* bound to DNA; *Nature* **388**: 97-100
- Wilson, G.G. & Murray, N.E. (1991); Restriction and modification systems; *Annu. Rev. Genet.* **25**: 585-627
- Windolph, S. & Alves, J. (1997-a); Influence of divalent cations on inner-arm mutants of restriction endonuclease *EcoRI*; *Eur. J. Biochem.* **244**: 134-139

- Windolph, S., Fritz, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H. & Alves, J. (1997-b); Sequence context influencing cleavage activity of the K130E mutant of the restriction endonuclease *EcoRI* identified by a site selection assay; *Biochemistry* **36**: 9478-9485
- Winkler, F.K., Banner, D.W., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R.S., Heathman, S.P., Bryan, R.K., Martin, P.D., Petratos, K. & Wilson, K.S. (1993); The crystal structure of *EcoRV* endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments; *EMBO J.* **12**: 1781-1795
- Wolfes, H., Alves, J., Fliess, A., Geiger, R. & Pingoud, A. (1986); Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 and Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *EcoRI*; *Nucleic Acids Res.* **14**: 9063-9080
- Woodbury, C.P.Jr., Hagenbuchle, O. & Von Hippel, P.H. (1980); DNA site recognition and reduced specificity of the *EcoRI* endonuclease; *J. Biol. Chem.* **255**: 11534-11546
- Woodhead, J.L. & Malcolm, A.D.B. (1980); Non-specific binding of restriction endonuclease *EcoRI* to DNA; *Nucleic Acids Res.* **8**: 389-402
- Woodhead, J.L., Bhawe, N. & Malcolm, A.D.B. (1981); Cation dependence of restriction endonuclease *EcoRI* activity; *Eur. J. Biochem.* **115**: 293-296
- Wright, D.J., King, K. & Modrich, P. (1989); The negative charge of Glu-111 is required to activate the cleavage center of *EcoRI* endonuclease; *J. Biol. Chem.* **264**: 11816-11821
- Yanofsky, S.D., Love, R., McClarin, J.A., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1987); Clustering of null mutations in the *EcoRI* endonuclease; *Proteins* **2**: 273-282
- Yuan, R., Hamilton, D.L., Hadi, S.M. & Bickle, T.A. (1980); Role of ATP in the cleavage mechanism of the *EcoP15* restriction endonuclease; *J. Mol. Biol.* **144**: 501-519

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, daß die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Oktober 2003

Lebenslauf

Name: Imke Peters
Geburtsdatum: 14. Februar 1975
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet

Schulbildung

August 1981 bis Juli 1985 Grundschole Buchholz
August 1985 bis Juli 1994 Gymnasium Brunsbüttel
Juli 1994 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 1994 bis Juni 1999 Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
September 1996 Diplomvorprüfung
Dezember 1998 bis Juni 1999 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover bei Herrn Prof. T. Scheper mit dem Thema „Innovative Sensorsysteme für die biotechnologische Praxis“
Juni 1999 Verleihung des Grades Diplom-Chemikerin

Berufstätigkeit

Oktober 1999 bis Februar 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der ZA für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
März 2000 bis Dezember 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Herrn Prof. J. Alves