Bedeutung hydrophober Kontakte für die sequenzspezifische DNA-Erkennung der Restriktionsendonuklease *Eco*RI

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

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biochem. Wolfgang Küster
geboren am 04.11.1966

1998

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. J. Alves) der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.03.1995 bis zum 08.05.1998 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Alves angefertigt.

Tag der Promotion: 22.06.1998

Referent: Prof. Dr. J. Alves
Korreferent: Priv. Doz. Dr. W. Müller

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht, beziehungsweise entsprechende Skripte befinden sich in Vorbereitung:

Fritz, A., Küster, W. & Alves, J.
Asn141 is essential for DNA recogniton by *Eco*RI restriction endonuclease.
Manuskript eingereicht

Küster, W., Rosati, O., & Alves, J.
Ile197 does not contribute to DNA recognition by the *Eco*RI restriction endonuclease.
Manuskript in Vorbereitung

Küster, W., & Alves, J.
Changing a hydrophobic contact by methionine to a hydrogen bond by glutamine in the restriction endonuclease *Eco*RI results in an equally effective DNA recognition.
Manuskript in Vorbereitung

Küster, W., & Alves, J.
Hydrophobic contacts by Gly140 and Ala142 are important for DNA recognition by the *Eco*RI restriction endonuclease.
Manuskript in Vorbereitung

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. J. Alves danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

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

Herrn Dr. Heiner Wolfes danke ich für die Synthese der Oligonukleotide sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Reinhard Sokolowski danke ich für seinen Anteil, den er dazu beigetragen hat, daß ich es in drei Jahren zum „Ehren-Myb-Anwärter“ geschafft habe.

Frau U. Kayßer möchte ich hiermit für die hervorragende technische Assistenz und ihr stetiges außerordentliches Engagement danken.

Frau Petra Vennekohl danke ich für unterhaltsame Stunden im Labor, die interessanten Diskussionen während diverser Kongresse, sowie die Bereitschaft diese Arbeit auf Unzulänglichkeiten hin zu überprüfen.

Frau Gabriele Grabowski danke ich hiermit für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag in Verbindung mit ständiger Diskussionsbereitschaft, für die Bereitschaft Mediziner an meiner Stelle zu verarzten, sowie den kritischen Blick, der ständig auf der Entstehung dieser Arbeit lag, und ohne den sie nicht in der hier vorliegenden Form entstanden wäre.

Herrn Dr. Andreas Kiewitz danke ich für die vielen angenehmen Stunden während der Promotion.

Herrn Olaf Rosati danke ich dafür, daß er sofort geholfen hat, als es notwendig war.

Allen Abteilungsmitgliedern danke ich für das kreative Arbeitsklima.

Abkürzungsverzeichnis

A	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
Å	10^{-10} m
AAP	Agaroseauftragspuffer
Ado Met	S-Adenosylmethionin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
C	2'-Desoxycytidin-5'monophosphat
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propan sulfonat
Ci	Curie
cfu	*colony forming units*
d	Desoxy-
D	Dalton
dd	Didesoxy-
DEAE	Diethyaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	äquimolare Mischung der 2'-Desoxyribonukleosid-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythriol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ε_x	Extinktionskoeffizient bei x nm
G	2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
His	Histidin
His-tag	His-Hexapeptid
k_{kat}	katalytische Geschwindigkeitskonstante
K_{ass}	Assoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LAP	Laemmli-Auftragspuffer
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampère
MESH	β-Mercaptoethanol
min	Minute(n)
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

n	nano
Ni-NTA	Nickel^{2+}-Nitrilotriacetat
NP40	Nonidet P40
oc	*open circular* (offen zirkulär)
OD_{xxx}	optische Dichte bei xxx nm
Oligonukleotid	oligomeres Desoxyribonukleotid
PAAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphat Buffered Saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Polymerase Ketten Reaktion)
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAP	Sequenzierauftragspuffer
sc	*supercoiled* (superhelikal)
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfat* (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS
ss	*single stranded* (einzelsträngig)
ST	*Saline* TRIS
T	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS *Buffered Saline*
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPE	TRIS-Phosphat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTE	TRIS-Taurin-EDTA
U	Unit (Aktivitätseinheit für Enzyme)
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp

Aminosäuren werden unter Verwendung des international üblichen Ein-Buchstaben beziehungsweise Drei-Buchstaben Codes abgekürzt. Eine Zahl hinter der Aminosäure kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins.
Mutanten werden nach folgendem Schema benannt: Alte Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code), Positionsnummer, neue Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code).
Alle Mutanten wurden in dieser Arbeit als C-terminale His_6-Fusionsproteine kloniert.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Restriktionsenzyme 1
1.2 Die Restriktionsendonuklease *Eco*RI 3
1.2.1 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion 5
1.2.2 Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz 6
1.2.3 Struktur der Restriktionsendonuklease *Eco*RI im Vergleich mit anderen Restriktionsendonukleasen 8
1.2.4 Kopplung von spezifischer Substratbindung und Katalyse 11
1.2.5 Motive der DNA-Erkennung von *Eco*RI 12
1.2.5.1 Das *Extended Chain*-Motiv 12
1.2.5.2 Der *Outer Arm* 13
1.2.5.3 Der *Inner Arm* 14
1.2.5.4 Das β3-Faltblatt 15
1.2.5.5 Die α4-Helix 16
1.2.6 Katalyse 17
1.2.6.1 Mechanismus der Reaktion 17
1.3 Ziel der Arbeit 20
2 Material und Methoden 22
2.1 Mikrobiologische Methoden 22
2.1.1 Bakterienstämme 22
2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen 23
2.1.3 Transformation 24
2.1.4 Vektoren 24
2.2 Molekularbiologische Methoden 25
2.2.1 Mutagenesestrategien 26
2.2.1.1 *Gapped Duplex*-Mutagenese 26
2.2.1.2 PCR-Mutagenese 28
2.2.1.3 Mutagenese*primer* 32
2.2.2 DNA-Sequenzierung 35
2.2.2.1 *Annealing* 35
2.2.2.2 *Labelling* 36
2.2.2.3 Termination 36

2.2.2.4 Sequenziergel 37
2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten 38
2.3 Proteinisolierung 38
2.3.1 Expressionstest 38
2.3.2 Fermentation 38
2.3.3 Zellaufschluß 39
2.3.4 Affinitätschromatographie 39
2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie 40
2.3.5 Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli 41
2.3.6 Dialyse 42
2.3.7 UV-Spektroskopie 43
2.3.8 *Semi dry*-Western *Blot* (Immuno*blot*) 43
2.4 Kinetische Charakterisierung 44
2.4.1 Spaltkinetiken mit λ-DNA 44
2.4.2 Spaltkinetiken auf Plasmidebene 45
2.4.2.1 Kinetische Untersuchungen mit pUC8-Derivaten Plasmiden 45
2.4.2.2 Spaltung eines *Randompools* aus pUC8-Derivaten zur Bestimmung von Seitensequenzpräferenzen 46
2.4.3 Kinetiken mit Oligonukleotiden 46
2.4.3.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden 49
2.5 DNA-Bindungsstudien 50
2.5.1 Gelretardationsexperimente *(Mobility Shift Assay)* 50
2.5.2 Nitrozellulose-Filterbindung 53
2.5.3 Bindungsexperimente unter Einfluß zweiwertiger Kationen 55
2.6 CD-Spektroskopie 55
3 Ergebnisse 57
3.1 Zielgerichtete Mutagenese 57
3.2 Protein-Aufarbeitung 59
3.3 CD-Spektren 63
3.4 Kinetische Charakterisierungen 64
3.4.1 Spaltverhalten mit λ-DNA 65
3.4.1.1 Spaltung von λ-DNA bei verschiedenen pH-Werten 70
3.4.2 Spaltkinetiken mit pUC8-Derivaten 71

3.4.2.1 Kinetische Untersuchungen an pUC8-Derivaten mit unterschiedlichen Seitensequenzen ... 71
3.4.2.2 Spaltverhalten der Mutante M137Q/N141A auf einem pUC8-*Randompool* ... 72
3.4.3 Kinetische Untersuchungen auf Oligonukleotidebene ... 72
3.4.3.1 Verwendung selbstkomplementärer Oligonukleotide zur Charakterisierung der Mutante M137H ... 72
3.4.3.2 Untersuchung des Spaltverhaltens auf modifizierten Oligonukleotiden ... 74
3.5 Bindungsverhalten der untersuchten *Eco*RI-Mutanten ... 78
3.5.1 Gel-Retardations-*Assays* ... 78
3.6.2 Nitrozellulose-Filterbindung ... 80
3.6.3 Bindungsexperimente unter dem Einfluß zweiwertiger Kationen ... 82
4 Diskussion ... 84
4.1 Aminosäureaustausche an der Position Met137 ... 84
4.2 Aminosäureaustausche an den Positionen Gly140 und Ala142 ... 90
4.3. Mehrfachmutanten zur Änderung oder Erweiterung der Spezifität ... 93
4.3.1 Aminosäureaustausche an Positionen, die in der Herstellung von Mehrfachmutanten Anwendung finden ... 94
4.3.1.1 Die Mutante H114T ... 94
4.3.1.2 Die Mutante I197A ... 94
4.3.1.3 Die Mutante N141A ... 94
4.3.1.4 Die Mutante A142G ... 94
4.3.2 Charakterisierung von Mehrfachmutanten ... 95
4.3.2.1 Die Mutante M137R/A142G ... 95
4.3.2.2 Die Mutante M137Q/A142G ... 95
4.3.2.3 Die Mutante M137Q/N141A ... 95
4.3.2.4 Die Mutante M137Q/N141A/I197A ... 96
4.3.2.5 Die Mutante M137Q/N141A/I197A/H114T ... 97
4.3.3 Weiterführende Ansätze zur Erweiterung oder Änderung der Sequenzspezifität ... 97
4.4 DNA-Bindungsmessungen von Mutanten mit Aminosäureaustauschen im *Extended Chain*-Motiv ... 99
5 Zusammenfassung ... 102
6 Literaturverzeichnis ... 106

1 Einleitung

1.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifisch kurze DNA-Sequenzen erkennen und diese in beiden Strängen spalten [Luria & Human, 1952]. Sie sind Teile von Restriktions/Modifikationssystemen (R/M-Systeme), die ubiquitär in prokaryontischen Organismen auftreten. Neben der Restriktionsendonuklease bestehen sie aus einer korrespondierenden Methyltransferase, die die zelleigene DNA durch Methylierung in der Erkennungssequenz vor Spaltung schützt. R/M-Systeme dienen prokaryontischen Organismen zur intrazellulären Abwehr eindringender Fremd-DNA, die zum Beispiel durch Viren in die Zelle gebracht werden kann, und nehmen ihr durch Spaltung in Teilstücke mittels der Endonuklease ihre Infektiösität. Gleichzeitig sind die entstehenden Teilstücke durch das Zusammenspiel von RecBCD-Exonuklease und RecA-Rekombinase leichter für eine homologe Rekombination zugänglich [Eggleston & West, 1997], so daß den R/M-Systemen auch eine evolutive Funktion zuzuschreiben ist. Das Auftreten der Restriktion und Modifikation wurde zunächst von Luria & Human (1952) beschrieben und von Arber & Dussoix (1962) aufgeklärt.

R/M-Systeme werden aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung ihrer Untereinheiten sowie anhand ihres Bedarfes an Kofaktoren unterschieden. Die Restriktionsendonukleasen können in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden, wobei der Klasse II die Unterklassen IIS und IIe zugeordnet werden [Pingoud & Jeltsch, 1997]. Inzwischen sind fast 2900 Restriktionsendonukleasen bekannt [Roberts & Macelis, 1997], wobei mittlerweile 18 vollständig charakterisierte Typ I-, 210 unterschiedliche Typ II- sowie vier unterschiedliche Typ III-Spezifitäten bekannt sind.

R/M-Systeme vom Typ I beinhalten drei Untereinheiten innerhalb eines Enzymkomplexes, die mit R, M und S bezeichnet werden. Die R-Untereinheit bewirkt die Restriktion, die M-Untereinheit die Modifikation und die S-Untereinheit die Spezifität des Systems. Sie benötigen ATP, S-Adenosyl-Methionin (AdoMet) und Mg^{2+} als Kofaktoren. Die Erkennungssequenz umfaßt eine Länge von sieben Basenpaaren (Bp) und ist unterbrochen. Die Spaltung der DNA erfolgt generell in großer Entfernung zur Erkennungssequenz. Aufgrund von Sequenzvergleichen und Sekundärstrukturvorhersagen wurde die Erkenntnis gewonnen, daß alle 51 bisher bekannten

sogenannten Erkennungsdomänen (*Target Recognition Domains*) der Typ I-R/M-Systeme eine identische Tertiärstruktur besitzen [Sturrock *et al.,* 1997].

Typ II-R/M-Systeme beinhalten zwei separate Enzyme: Die Restriktionsendonuklease, die als Homodimer auftritt und nur Mg^{2+} zur DNA-Spaltung benötigt, und die monomere Methyltransferase, die AdoMet als Kofaktor verwendet. Beide Enzyme erkennen die gleiche DNA-Sequenz mit einer Länge von vier bis acht Bp. Modifikation und Spaltung treten in der Regel innerhalb der Erkennungssequenz auf. Die beiden Unterklassen der Typ II-R/M-Systeme definieren sich zum einen durch allosterische Aktivierung ausgehend von einer zweiten Erkennungssequenz (Typ IIe) [Krüger *et al*., 1995] und zum anderen durch die Spaltung durch eine monomere Endonuklease, die die DNA in definiertem Abstand außerhalb der Erkennungssequenz spaltet (Typ IIS). Das Auftreten einer monomeren Endonuklease ist durch Röntgenstrukturuntersuchungen des Proteins in Abwesenheit von DNA belegt worden [Wah *et al*., 1997].

Typ III-R/M-Systeme bestehen aus zwei Untereinheiten (R und M), wobei die M-Untereinheit in Anwesenheit von AdoMet für die Methylierung verantwortlich ist. Die Spaltung hingegen erfordert sowohl die Kooperation beider Untereinheiten als auch die Gegenwart von ATP, das jedoch während der Reaktion nicht hydrolysiert wird. Die Modifikation findet innerhalb der Erkennungssequenz statt, die sich etwa 25 Bp stromabwärts der Spaltstelle befindet [Bickle, 1993]. Die Erkennungssequenzen sind asymmetrisch, nicht unterbrochen und haben eine Länge von fünf bis sechs Bp.

Zu einer weiteren Gruppe, den Typ IV-R/M-Systemen, werden Restriktionsendonukleasen zusammengefaßt, deren Spaltung durch AdoMet stimuliert wird, jedoch ATP-unabhängig ist. Die Erkennungssequenz besteht aus einer asymmetrischen sechs Bp langen Sequenz, wobei die Spaltung in definiertem Abstand außerhalb der Erkennungssequenz stattfindet [Janulaitis *et al*., 1992, 1992a].

Im Gegensatz zu den Restriktionsenzym-Genen zeigen die bisher sequenzierten Methylase-Gene untereinander ausgeprägte Sequenzhomologien [Klimasauskas *et al*., 1994; Pingoud & Jeltsch, 1997], vor allem in den Bereichen, die für die Kofaktorbindung notwendig sind.

1.2 Die Restriktionsendonuklease *Eco*RI

Die Restriktionsendonuklease *Eco*RI wurde zuerst aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert. Später konnte aus *Rhodobacter sphaeroides* das sehr homologe Isoschizomer *Rsr*I charakterisiert werden. *Eco*RI besteht aus 276 Aminosäuren (31kDa) bekannter Sequenz [Greene *et al*., 1981; Newman *et al*., 1981]. Es ist als Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten aktiv [Alves *et al*., 1982], die zusammen eine globuläre Struktur besitzen [McClarin *et al*., 1986]. Das Symmetriezentrum des Dimers fällt bei der Substratbindung mit der Symmetrieachse der Erkennungssequenz zusammen, so daß auch der Enzym-DNA-Komplex die Symmetrie der Spaltsequenz widerspiegelt. Jedes Monomer besitzt als Teilstruktur den sogenannten *„Inner Arm*“ (siehe Abbildung 1), der bei der Bindung die DNA umschlingt, den Komplex stabilisiert und die Schnittstelle „verankert“ [Kim *et al*., 1990].

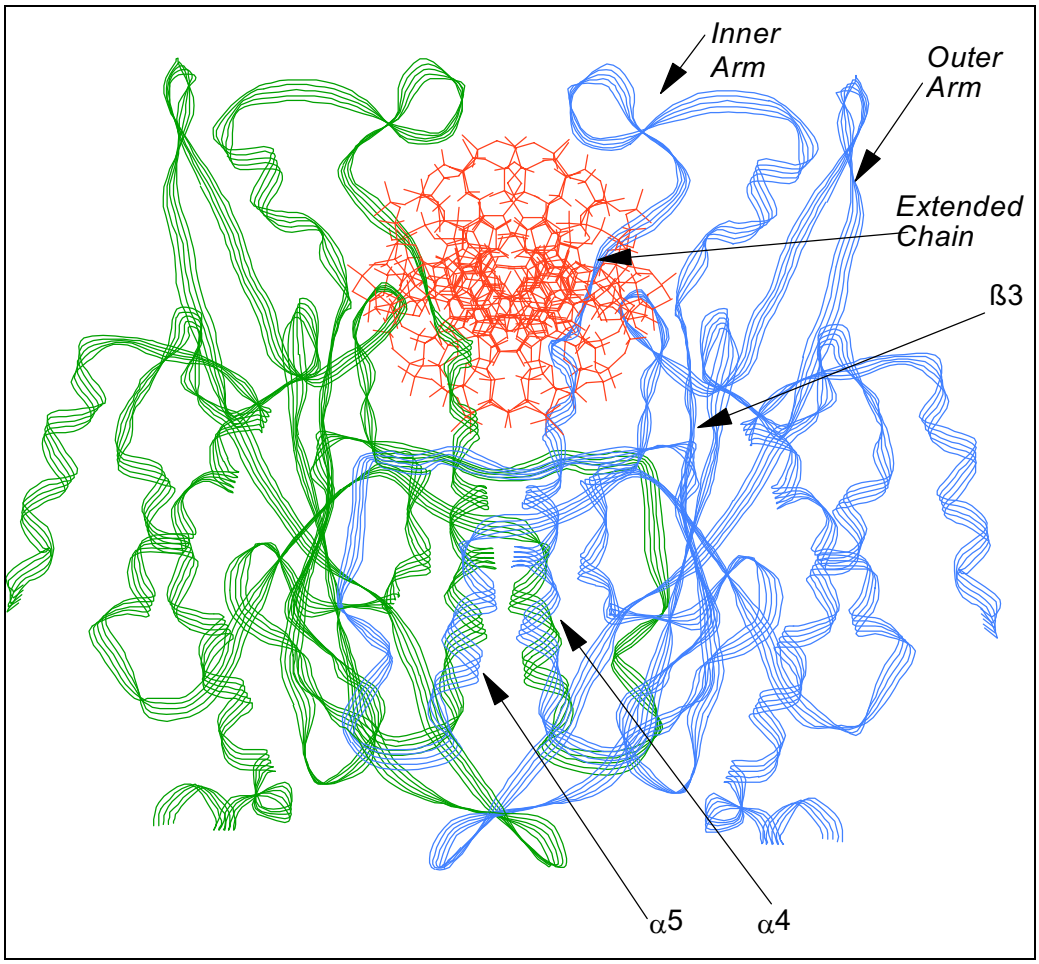

Abb. 1: Struktur des *Eco*RI-DNA-Komplexes entlang der DNA-Achse gesehen

Bei der *Eco*RI-Methylase liegt keine Homologie zur Endonuklease vor. Beide Enzyme erkennen jedoch die palindrome[1] Spaltungssequenz GAATTC [Hedgpeth *et al*., 1972]. Diese Sequenz besitzt eine Punktsymmetrie und wird an identischen, symmetrisch angeordneten Positionen in beiden Strängen gespalten. Durch die Methylase erfolgt eine Methylierung an der N6-Aminogruppe der zentralen Adenine in der unten aufgeführten Sequenz [Dugaiczyk *et al*., 1974] (siehe Abbildung 2).

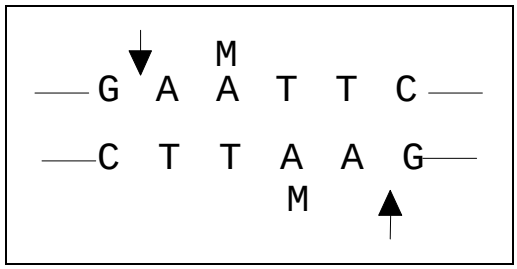

Abb. 2: *Eco*RI Erkennungssequenz (methylierte Adenine (M))

*Eco*RI zählt gemeinsam mit *Eco*RV zu den am besten untersuchten Restriktionsendonukleasen. Neben diesen beiden sind die Strukturen zweier weiterer Typ II-Restriktionsendonukleasen im DNA-Kokristall bekannt. Hierbei handelt es sich um *Pvu*II und *Bam*HI [Athanasiadis *et al*., 1994; Newman *et al*., 1994]. Auffällig ist bei einem Vergleich der vier Strukturen eine identische Anordnung von zwei sauren Aminosäuren und einer basischen Aminosäure zu der zu spaltenden Phosphodiesterbindung (*Eco*RI: Asp91, Glu111, Lys113; *Eco*RV: Asp74, Asp90, Lys92; *Pvu*II: Asp58, Glu68, Lys70; *Bam*HI: Asp94, Glu111 und Glu113), wobei bei *Bam*HI der Lysinrest durch einen Glutaminsäurerest ersetzt ist. Sie sind Bestandteil ähnlicher Sekundärstrukturelemente innerhalb der katalytischen Zentren der ansonsten bezüglich ihrer Erkennungssequenz völlig verschiedenen Enzyme [Thielking *et al.,*1992].

Eine erste Röntgenstruktur der *Eco*RI-Endonuklease im Komplex mit dem Oligonukleotid d(TCGCGAATTCGCG)$_2$ wurde 1986 veröffentlicht [McClarin *et al*., 1986]. Das daraus erarbeitete Strukturmodell nach der Analyse von weiteren *Eco*RI-Schwermetall-Derivaten jedoch 1990 korrigiert [Kim *et al*., 1990]. Die beiden *Eco*RI-Untereinheiten bilden im Dimer eine annähernd globuläre Struktur von 5nm Durchmesser aus, die die DNA umschließt.

Die *Eco*RI-Erkennungssequenz weist in freier Lösung hauptsächlich eine B-DNA-ähnliche Konformation auf [Lane *et al.,* 1991]. Durch die Bindung des Enzyms an die DNA erfährt sie jedoch ausgeprägte Konformationsänderungen, wie geänderte Basenrollwinkel und eine drasti-

[1] griechisch : palindromos = „wieder zurücklaufend“

sche Umwandlung der Konformation der inneren AT-Basenpaare. Die wichtigste Konformationsänderung ist ein *type 1 Neokink* [Rosenberg, 1991], das bedeutet, die Doppelhelix knickt im Zentrum der Erkennungssequenz, die Helix wird um 28° entwunden, und die große Furche öffnet sich um etwa 0,35nm. Dadurch wird das Einlagern von je zwei α-Helices und einem ausgestreckten Abschnitt der Polypeptidkette pro Untereinheit des Enzyms (*Four Barrel*-Helixmotiv und *Extended Chain*-Motiv) in die große Furche ermöglicht und die Erkennung der Basensequenz bewirkt. Die dadurch bedingte Öffnung der kleinen Furche der DNA hat keinen Einfluß auf die Wechselwirkung mit dem Protein, sondern bleibt dem Lösungsmittel zugewandt.

1.2.1 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion

Aufgrund der biologischen Funktion von Restriktionsendonukleasen ist eine effiziente Spaltung des Substrates notwendig, bevor die Methylase die DNA modifiziert und sie somit vor einem Zugriff schützt. Dies erfordert eine außerordentlich schnelle Erkennung der spezifischen Sequenz vor einem großen Hintergrund unspezifischer Sequenzen. Die Restriktionsendonuklease hat dieses Problem durch eine schnell erfolgende unspezifische Bindung an die DNA mit anschließender eindimensionaler linearer Diffusion gelöst [*Eco*RI: Woodhead & Malcome, 1981; *Eco*RV: Taylor *et al.,* 1992]. Die Assoziation an Oligonukleotide ist in Fluoreszenz-*Stopped Flow*-Experimenten untersucht worden [Alves *et al.,* 1989]. Hier konnte gezeigt werden, daß diese diffusionskontrolliert ist.

In der Regel ist die unspezifische Bindung in Abwesenheit von Magnesiumionen ($K_{ass} \approx 10^5\ M^{-1}$) [Langowski *et al*., 1981; Terry *et al*., 1983] schwach im Vergleich zur spezifischen Bindung ($K_{ass} \approx 10^8$-$10^{10}\ M^{-1}$ mit Nitrozellulose-Filterbindung), [Engler *et al.,* 1997] beziehungsweise ($5 \times 10^8\ M^{-1}$ mit Gel-Retardations-*Assay*) [Grabowski *et al*., 1995]. Wie in der Röntgenstruktur von *Eco*RV in unspezifischer Bindung zur DNA zu sehen ist, werden lediglich fünf Kontakte zwischen Aminosäureresten des Proteins und Phosphatgruppen der DNA ausgebildet [Winkler *et al.,* 1993; Kostrewa & Winkler, 1995]. Es ist kein direkter Kontakt zu den Basen der DNA zu erkennen, worin die Erklärung zu dieser deutlich schlechteren Bindungskonstante mit unspezifischer DNA auch in Gegenwart zweiwertiger Kationen zu sehen ist [Selent *et al*., 1992; Vipond *et al*., 1995]. Ein vergleichbarer Kokristall mit *Eco*RI in unspezifischer Bindung an die DNA existiert jedoch nicht.

Die an die unspezifische Bindung der DNA anschließende lineare Diffusion wurde zuerst für den *lac*-Repressor [Barkley, 1981] und anschließend auch für Restriktionsendonukleasen gezeigt [Jack *et al.,* 1982; Ehbrecht *et al*., 1985]. Mit Hilfe dieser Methode tastet das Enzym die DNA mit einer Geschwindigkeit von 7 x 10^6 Bp s^{-1} ab [Ehbrecht *et al*., 1985]. Der Prozeß der linearen Diffusion ist von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und DNA abhängig. Diese Wechselwirkungen sind anziehenden und abstoßenden Charakters und müssen in einem Gleichgewicht miteinander stehen, um eine optimale lineare Diffusion zu ermöglichen. Allerdings ist die lineare Diffusion nicht gleichmäßig, sondern variiert in Abhängigkeit von Sequenz und Struktur der DNA [Jeltsch *et al*., 1994]. Sogenannte *Star*sequenzen (Sequenzen, die sich in einem Basenpaar von der Erkennungssequenz unterscheiden) werden von den Enzymen wesentlich besser gebunden als unspezifische DNA [Lesser *et al*., 1990; Thielking *et al*., 1990]. Hier pausiert die lineare Diffusion, doch findet in der Regel keine Spaltung statt [Jeltsch *et al*., 1994]. Die grundlegende Bedeutung einer optimalen linearen Diffusion liegt in schneller Spaltung der Fremd-DNA durch die Restriktionsendonuklease, die für die ganze Zelle entscheidend sein kann. Dies konnte in *in vivo*-Experimenten für *Eco*RV gezeigt werden. Mutanten, deren Wechselwirkung zum Phosphodiesterrückgrat beinträchtigt war, zeigten auch eine Beeinflussung der linearen Diffusion, die mit abnehmender Fähigkeit korreliert war, eindringende Phagen-DNA abzuwehren [Jeltsch *et al.,* 1996].

1.2.2 Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der Restriktionsendonukleasen ist die außerordentlich hohe Präzision in der Katalyse und Substraterkennung *in vivo* wie auch *in vitro*. Diese hohe Spezifität der Restriktionsendonukleasen stellt das Resultat einer Vielzahl von Wechselwirkungen des Proteins mit der zu spaltenden DNA-Sequenz dar, die sich nicht nur in der Qualität, sondern auch in der Quantität von denen zur unspezifischen DNA unterscheidet. Die Bildung dieser bevorzugten Wechselwirkungen wird in der Summe als Erkennung bezeichnet. Sie beginnt mit dem Übergang vom unspezifischen in den spezifischen Komplex und schließt mit der Aktivierung des katalytischen Zentrums ab. Geänderte Pufferbedingungen, Mutationen oder verschiedene Kofaktoren nehmen hierbei unterschiedliche Einflüsse auf die Substraterkennung beziehungsweise Katalyse.

Erfolgt die Reaktion unter entsprechenden Bedingungen (erhöhter pH-Wert in Verbindung mit niedriger Ionenstärke, Mangan anstelle von Magnesium als zweiwertiges Kation oder Zugabe organischer Lösungsmittel) [Polisky *et al*., 1975; Goodman *et al*., 1977; Hsu & Berg, 1978],

so können auch Substrate, die in einer Base von der GAATTC-Sequenz abweichen, erkannt, allerdings mit deutlich verminderter Aktivität gespalten werden [Gardner *et al*., 1982; Lesser *et al.,* 1990; Thielking *et al.,* 1990].

Entgegen früherer Vorstellungen bildet *Eco*RI sowohl mit Purin- wie auch mit Pyrimidinbasen in der GAATTC-Sequenz spezifische Wechselwirkungen aus. Nach Rosenberg (1991) erfolgt die Substraterkennung über 18 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen DNA und Protein, wobei 14 Protein-Purin- und vier Protein-Pyrimidin-Wechselwirkungen ausgebildet werden. Ferner existieren Wasserstoffbrücken zwischen der Guaninbase, einem Wassermolekül und den zwei Aminosäureseitenketten Arg200 und Arg203. Außerdem gibt es eine Vielzahl van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA. So bilden die Aminosäuren Gln115, Met137, Gly140 und Ala142 hydrophobe Kontakte zu den Basenpaaren der Erkennungssequenz aus. Eine zentrale Rolle wird der Vernetzung vieler Kontakte durch die Aminosäure Glu144 zugeschrieben, die sowohl über Wasserstoffbrückenbindungen, wie auch ionische Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Asn141 und Arg203 derselben Untereinheit, sowie den Aminosäuren Arg145 und Lys148 der anderen Untereinheit in Kontakt steht. Spezifische Kontakte zum Phosphatrückgrat der DNA werden zusätzlich zu denen der Basenpaare ausgebildet.

Die Summe aller Wechselwirkungen läßt den Schluß zu, daß es sich hierbei um ein redundantes System handelt. Das führt dazu, daß bei dem Verlust einzelner Wechselwirkungen die verbleibenden Kontakte ausreichen, um eine spezifische Substraterkennung zu gewährleisten, die Spaltaktivität jedoch häufig vermindert ist [Alves *et al.,*1989a; Geiger *et al.,*1989; Heitman, 1992]. Das Haupterkennungsmotiv von *Eco*RI zu den Basen ihrer spezifischen Erkennungssequenz stellt das bereits erwähnte sogenannte *Extended Chain*-Motiv dar, auf das aufgrund seiner bedeutenden Stellung innerhalb dieser Arbeit später eingegangen wird.

Eine wesentliche Rolle in Bezug auf den Erkennungsprozeß kommt ebenfalls dem eingesetzten Metallion zu. Zum einen führt lediglich die Zugabe von Magnesium oder Mangan mit geringerer Effektivität auch Kobalt oder Nickel [Woodhead & Malcolm, 1981; Vipond *et al.,* 1995] zu einer Spaltung der DNA.

Neben der essentiellen Rolle in der Katalyse nehmen zweiwertige Kationen aber auch Einfluß auf die Konformation der *Eco*RI. Das Wildtypenzym liegt in ihrer Abwesenheit in einer inaktiven Konformation vor, aus der heraus es nur langsam mit der DNA reagieren kann [Alves *et al*., 1989a]. Für eine Mutante von *Eco*RI (K130E) konnte außerdem gezeigt werden, daß die spezifische Bindung nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen erfolgt, und daß Kalzium in ei-

nem bestimmten Verhältnis zu den eingesetzten Magnesiumionen zu einer Erhöhung der Spaltaktivität führt, jedoch ist auch hier die Zugabe von Magnesium für eine katalytische Aktivität notwendig [Windolph *et al*., 1997].

1.2.3 Struktur der Restriktionsendonuklease*Eco*RI im Vergleich mit anderen Restriktionsendonukleasen

Erstaunlicherweise treten in den bisher sequenzierten 50 Typ II-Restriktionsendonukleasen keinerlei Anzeichen der klassischen DNA-Bindungsmotive wie Helix-*Turn*-Helix (Ausnahme: *Fok*I) [Wah *et al*., 1997], Zink-Finger, basischer Helix-*Loop*-Helix oder basischer *Zipper* auf [Pingoud & Jeltsch, 1997]. Es sind fünf Typ II-Restriktionsendonukleasen kristallisiert. Hier handelt es sich um *Eco*RI [Rosenberg, 1991], *Eco*RV [Winkler *et al*., 1993], *Bam*HI [Newman *et al*., 1994], *Pvu*II [Athanasiadis *et al*., 1994; Cheng *et al*., 1995] und *Cfr*10I [Bozic *et al*., 1996]. Da es sich bei *Cfr*10I um ein Enzym mit degenerierter Sequenzerkennung handelt, ist eine Zuordnung homologer Aminosäuren zu anderen Restriktionsendonukleasen nicht eindeutig möglich, da dieser Kristall nur ohne DNA existiert. Sie ist daher für einen Vergleich nur von untergeordneter Bedeutung.

Interessanterweise nutzen die vier anderen kristallisierten Typ II-Restriktionsendonukleasen unterschiedliche Strukturmotive, um eine spezifische DNA-Erkennung durchzuführen. Wie unter 1.2.2 bereits erwähnt, bildet *Eco*RI über das sogenannte *Extended Chain*-Motiv, welches sich durch die große Grube der DNA zieht, Kontakte zu seiner Erkennungsequenz aus [Kim *et al*., 1990]. Andere Restriktionsendonukleasen erkennen die DNA spezifisch über α-Helices, angrenzende Schleife und C-terminalen Arm (*Bam*HI) [Newman *et al.*, 1994], Schleifen (*Eco*RV) [Winkler *et al*., 1993] oder β-Faltblätter (*Pvu*II) [Athanasiadis *et al*., 1994; Cheng *et al.,* 1995]. Ein Strukturvergleich zeigt, daß es sich bei all diesen Proteinen um αβ-Proteine handelt, die ein gemischtes, zentrales fünfsträngiges β-Faltblatt, das von zwei α-Helices umgeben ist, besitzen (siehe Abbildung 3).

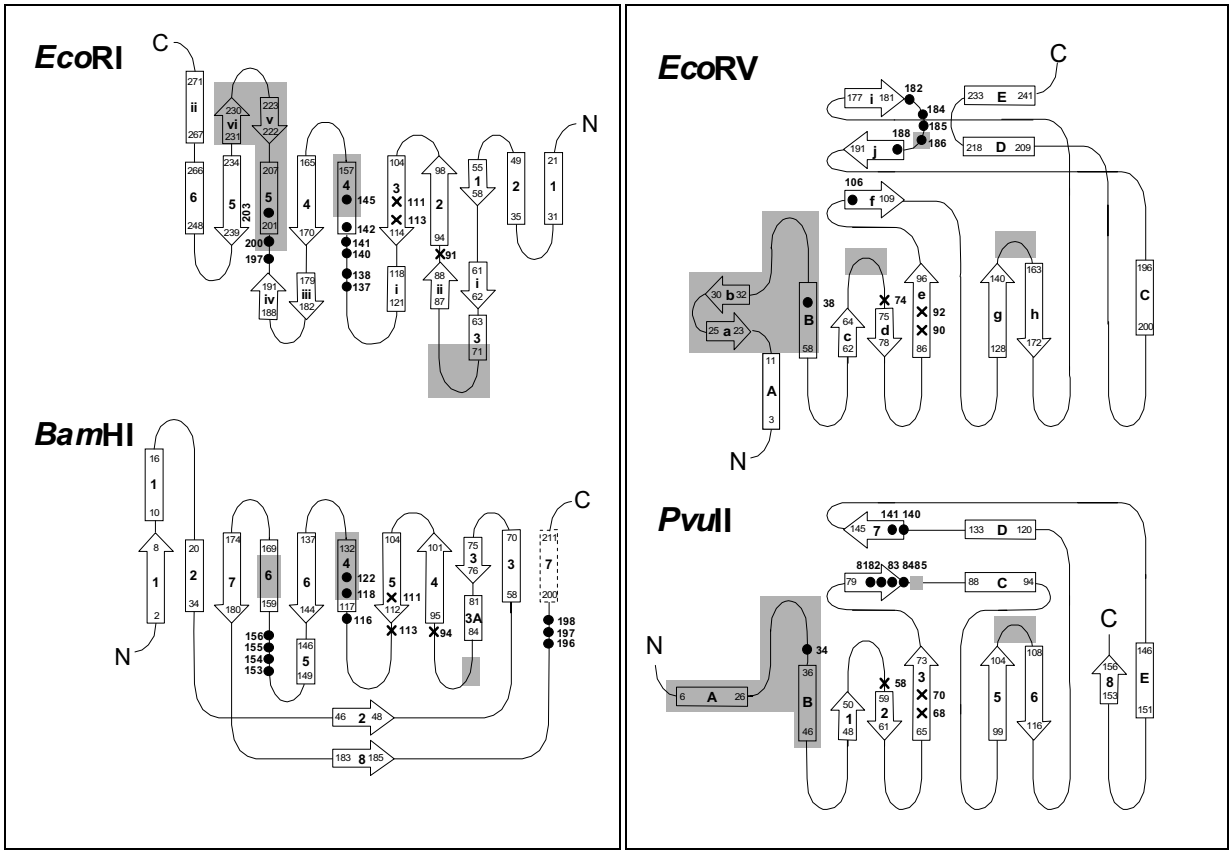

Abb. 3: Sekundärstrukturelemente der Restriktionsendonukleasen im Vergleich. An der Katalyse be teiligte Aminosäuren sind durch ein Kreuz (x), an der Bindung beteiligte Aminosäuren durch einen Punkt (•), in die Dimerisierung involvierte Regionen als graue Flächen gekennzeic hnet

Alle vier Enzyme zeigen in ihrer Sekundärstruktur im katalytischen Zentrum große Ähnlichkeit, wobei jedoch die Aminosäuresequenzen deutlich voneinander abweichen. Aufgrund unterschiedlicher Erkennung der DNA (*Eco*RI und *Bam*HI nähern sich der DNA an der großen Grube, *Eco*RV und *Pvu*II an der kleinen Grube), wie auch in Bezug auf ihre sekundären Strukturelemente, kann man eine Unterscheidung von *Eco*RI und *Bam*HI auf der einen Seite sowie *Eco*RV und *Pvu*II auf der anderen Seite treffen. Beide Gruppen unterscheiden sich ebenfalls hinsichtlich ihrer Monomer-Monomer-Interaktionsfläche. Der Unterschied, daß sich *Eco*RI und *Bam*HI von der großen Grube und *Eco*RV und *Pvu*II von der kleinen Grube her nähern, könnte auf die unterschiedlichen relativen Positionen der zu spaltenden Phosphodiesterbindungen zueinander zurückzuführen sein, da es sich bei *Eco*RV und *Pvu*II um sogenannte *Blunt End*-Schneider, bei *Eco*RI und *Bam*HI um *Sticky End*-Schneider handelt. Kognate Sequenzen, deren Spaltung einen 5'-Überhang von einigen Nukleotiden entstehen lassen (*Eco*RI und *Bam*HI), sind besser von der großen Grube her zugänglich, wohingegen Bindungen, deren Spaltung *Blunt Ends* erzeugen, eher über die kleine Grube zugänglich sind (Anderson *et al.,* 1993).

Die Strukturanalyse von *Eco*RI zeigt, daß die DNA bei der spezifischen Bindung an das Enzym in der Art verzerrt wird, daß ein Knick sowie eine Entwindung in der zentralen AATT-Sequenz von 28° entsteht [Kim *et al.,* 1990]. Dies führt dazu, daß die *Stacking*-Wechselwirkungen aufgehoben werden und die große Grube aufgeweitet wird. Im Komplex mit *Star*-Sequenzen besitzt *Eco*RI eine deutlich andere asymmetrische Konformation als im kanonischen Komplex [Kim *et al*., 1990].

Im Gegensatz zu *Eco*RI verzerrt *Bam*HI während der spezifischen Bindung die DNA nicht, obwohl die DNA ebenfalls von zwei Helices und einer angrenzenden Schleife innerhalb der großen Grube gebunden wird. Zusätzlich findet eine Wechselwirkung der C-terminalen α-Helix nur einer Untereinheit in der kleinen Grube der DNA statt. In der Summe wechselwirkt *Bam*HI mit seiner Erkennungssequenz über zwölf direkte und sechs indirekte (wasservermittelte) Wasserstoffbrückenbindungen in der großen Grube, sowie drei direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit der kleinen Grube der DNA. Zusätzlich bildet *Bam*HI van der Waals- Kontakte mit seiner Erkennungssequenz sowie Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat der DNA aus. Interessanterweise kontaktiert *Bam*HI die DNA über Kreuz. Das bedeutet, daß ein Großteil der Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat der einen Hälfte der DNA von der Untereinheit des Enzyms ausgebildet wird, die die hauptsächlichen Wechselwirkungen zu den Basen des komplementären Stranges der DNA ausbilden. Die Strukturen von *Bam*HI und *Eco*RI haben große Homologien, so daß ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vermutet wird [Newman *et al*., 1994]. Dies wird dadurch gestützt, daß beide Enzyme ein Vier-Helix-Bündel (jeweils zwei Helices pro Untereinheit) sowohl zur Dimerisierung als auch zur DNA-Erkennung nutzen. Im Gegensatz dazu besitzt *Bam*HI jedoch keine equivalenten Motive zu *Extended Chain, Inner Arm* oder *Outer Arm* in *Eco*RI.

Da für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV Röntgenstrukturdaten für den unspezifischen Komplex mit der DNA wie auch für den spezifischen Komplex existieren, lassen sich gute Aussagen über konformationelle Änderungen und zusätzliche Kontakte treffen, die während der spezifischen Erkennung ausgebildet werden [Winkler *et al*., 1993; Kostrewa & Winkler, 1995]. Die offensichtlichste Änderung ist die Entwindung der DNA durch einen Knick von 55° in der Mitte der Erkennungssequenz. Hierbei werden, analog zu *Eco*RI, die *Stacking*-Wechselwirkungen der zentralen Basenpaare innerhalb der Erkennungssequenz aufgehoben. Durch diesen Prozeß wird die DNA in der Weise deformiert, daß die große Grube verengt, die kleine Grube jedoch erweitert und somit leichter zugänglich für die Spaltung gemacht wird.

Das hauptsächliche Erkennungsmotiv von *Eco*RV wird als Erkennungsschleife (*R-loop*) bezeichnet, welche für die Ausbildung von zwölf der 18 direkten Wasserstoffbrückenbindungen, zwei van der Waals-Kontakte zur Erkennungssequenz sowie zwölf wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat der DNA verantwortlich ist. Ein weiterer Anteil der DNA-Erkennung wird einer glutaminhaltigen Schleife (*Q-loop*) zugeschrieben. Diese Schleife bildet vier Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen der kleinen Grube aus und beinhaltet weiterhin die katalytisch wichtige Aminosäure Asp74. Beide *Loops* sind im Kristall des unspezifischen Komplexes von der DNA weiter entfernt und ohne direkten Kontakt zu den Basen. Die spezifische DNA-Bindung von *Eco*RV zeichnet sich auch durch ein großes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat der DNA aus. So liegen zusätzlich zu den beiden Erkennungsschleifen (*R*-und *Q-loop*) 24 Aminosäuren mit einer Donorfunktion oder einer positiven Ladung in räumlicher Nähe zum Phosphatrückgrat, so daß sich eine Wasserstoffbrücke ausbilden könnte. Die Tatsache, daß *Eco*RV Erkennungssequenzen, die eine bestimmte Sequenzumgebung aufweisen, bevorzugt spaltet, ist vermutlich durch die große Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat auch außerhalb der Erkennungssequenz begründet [Taylor & Halford, 1989; Wenz *et al.,* 1996]. Die Bedeutung der Phosphaterkennung für *Eco*RV zeigt die Tatsache, daß lediglich zwei der zwölf Phosphorylsauerstoffe innerhalb der kognaten Sequenz durch Schwefel ersetzt werden können, ohne daß eine Abnahme der Spaltaktivität auftritt [Wenz *et al*., 1996].

Die Restriktionsendonuklease *Pvu*II zeigt teilweise große Strukturhomologien zu *Eco*RV [Athanasiadis *et al.,* 1994; Cheng *et al*., 1995]. Sie verzerrt während der spezifischen Bindung jedoch nicht die DNA [Cheng *et al.,* 1995]. Das grundsätzliche Erkennungsmotiv von *Pvu*II besteht aus einem zweisträngigen antiparallelen β-Faltblatt. Durch die Aminosäurereste dieses Motivs werden zwölf direkte Wasserstoffbrückenbindungen und einige van der Waals-Kontakte sowohl zu den Basen der Erkennungssequenz als auch zum Phosphatrückgrat ausgebildet. Auch *Pvu*II bildet zu den Basen sowie zum Phosphatrückgrat außerhalb der Erkennungssequenz Kontakte aus.

1.2.4 Kopplung von spezifischer Substratbindung und Katalyse

Spezifische Substratbindung und Katalyse verlaufen *in vivo* wie auch *in vitro* mit hoher Präzision, wobei geänderte Pufferbedingungen, Mutationen oder verschiedene Kofaktoren Einflüsse sowohl auf die Substraterkennung als auch die Katalyse haben. Beide Prozesse sind außeror-

dentlich strikt miteinander gekoppelt [Jeltsch *et al*., 1993]. Dieses Phänomen wird in der Tatsache deutlich, daß jede Störung der Erkennung zu einer Verlangsamung der Katalyse führt. So konnte bisher keine *Eco*RI-Mutante erzeugt werden, die zwar in ihrer Spezifität, nicht jedoch in der Katalyse geschwächt beziehungsweise geändert wäre. Führt man an Positionen, die der DNA an den zu der Erkennungssequenz flankierenden Sequenzen räumlich nahe kommen, Aminosäuren ein, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, so werden außerhalb der Erkennungssequenz keine neuen Kontakte gebildet, die zur Erweiterung der Spezifität führen [Küster, 1995]. Eine solch strikte Kopplung wird auch bei der Analyse der Spaltung von *Star*sequenzen deutlich. Die hohe Spezifität für die kanonische Sequenz liegt sowohl in der Bindung, als auch in der Spaltung oder, gleichbedeutend damit, in der Kopplung der Erkennung an die Katalyse. Unter den in 2.4.1 aufgeführten Standardspaltbedingungen liegt die Assoziationskonstante der spezifischen Bindung für die Erkennungssequenz nur um den Faktor 10^3-10^4 höher als die für *Star*sequenzen. Die intrinsische Geschwindigkeitskonstante der kanonischen Doppelstrangspaltung liegt jedoch um den Faktor 10^5-10^6 höher als bei *Star*spaltung, was zu einer effektiven Diskriminierung der *Star*sequenzen führt [Thielking *et al.,* 1990; Lesser *et al*., 1990]. Eine Substitution des Magnesiums durch Mangan, wie auch eine Erhöhung des pH-Wertes in Verbindung mit einer Erniedrigung der Ionenstärke führt jedoch zu einer Relaxation der Spezifität [Gardner *et al*., 1982; Rosenberg & Greene, 1982].

1.2.5 Motive der DNA-Erkennung von *Eco*RI

1.2.5.1 Das *Extended Chain*-Motiv

Eine Vielzahl der direkten Wechselwirkungen gehen, wie in Abbildung 4 ersichtlich, vom *Extended Chain*-Motiv aus, welches aus den Aminosäuren 137-142 besteht und durch die räumlich benachbarten α-Helices verankert wird. Ein synthetisches Peptid mit der Sequenz des *Extended Chain*-Motivs konnte eine Spaltung durch *Eco*RI sowie *Xba*I (deren Spaltstelle mit der *Eco*RI-Spaltstelle überlappte) behindern. Demgegenüber wird eine *Xba*I-Spaltsequenz, die nicht mit einer *Eco*RI-Sequenz überlappt, auch in Anwesenheit des Peptids gespalten [Jeltsch *et al*., 1994a]. Die Aminosäureseitenketten der *Extended Chain* orientieren sich über van der Waals-Bindungen zu Pyrimidinen und über Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminogruppen der Pyrimidine und Adenine entlang der großen Grube der DNA. Folgende Kontakte der *Extended Chain* zu den Basen der Erkennungssequenz werden gebildet [Rosenberg, 1991]:

Met137: van der Waals-Kontakt zum H5, H6 des Cytosins;

Ala138: Wasserstoffbrückenbindung vom CO der Hauptkette N4 des Cytosins;

Gly140: van der Waals-Kontakt zur Methylgruppe des äußeren Thymins;

Asn141: schwache Wasserstoffbrückenbindung der Seitenkette zum N7 des äußeren Adenins, Wasserstoffbrückenbindungen der Carbonylfunktion der Seitenkette zum N6 des äußeren und des inneren Adenins;

Ala 142: Wasserstoffbrückenbindung der Amidgruppe der Hauptkette zum O4 des inneren Thymins, van der Waals-Kontakt zur Methylgruppe des inneren Thymins.

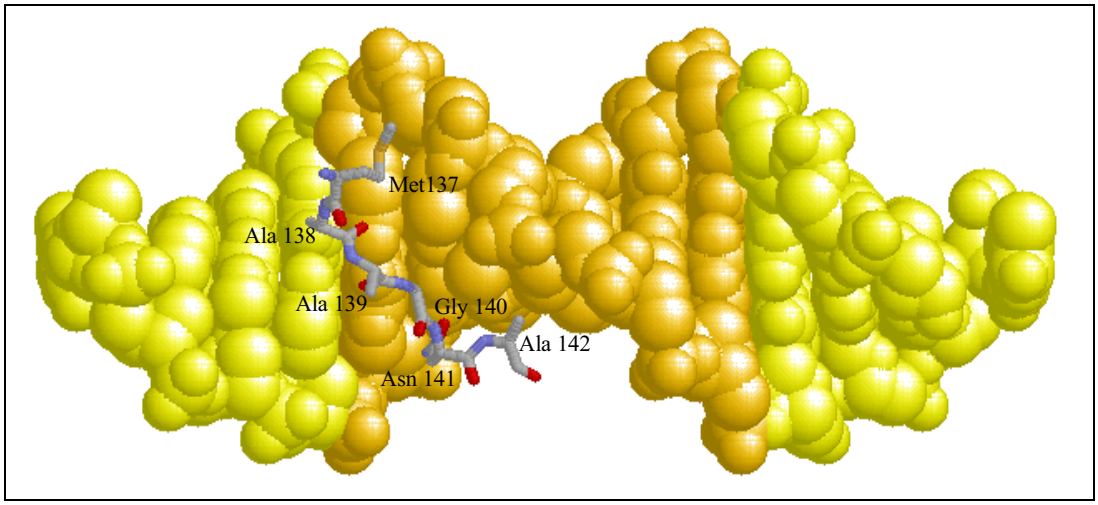

Abb. 4: Räumliche Lage des *Extended Chain*-Motivs der Restriktionsendonuklease *Eco*RI zu seiner spezifischen Erkennungssequenz -GAATTC- (dargestellt in Dunkelgelb)

1.2.5.2 Der *Outer Arm*

Über die Region des *Outer Arm* erstrecken sich vier β-Faltblattstrukturen, vier Strukturelemente ohne definierte Sekundärstruktur sowie eine α-Helix. Sie besteht aus den Aminosäuren 163 bis 225. Die folgenden Aminosäuren der *Outer Arm*-Region sind an der DNA-Bindung beteiligt [Rosenberg, 1991]:

Ile197: Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zum H6 des Cytosins der Erkennungssequenz;

Arg200: Ausbildung von Wechselwirkungen zu einem Wassermolekül, das seinerseits Wasserstoffbrückenbindungen zum Guanin der Erkennungssequenz ausbildet;

Arg203: Ausbildung von Wechselwirkungen zum selben Wassermolekül wie Arg200, Ausbildung eines Phosphatkontaktes außerhalb der Erkennungssequenz.

Die Aminosäure Ile197 trägt, wie im Verlauf dieser Arbeit sowie auch in Verbindung mit meiner Diplomarbeit bereits gezeigt werden konnte [Küster, 1995], nicht zur spezifischen Sequenzerkennung bei, sie wird hier lediglich aufgrund der Literaturangabe mit aufgeführt.
Weiterhin stabilisiert der *Outer Arm* das *Extended Chain*-Motiv über die Aminosäuren Gly196, Arg200, Asn199 sowie die *Inner Arm*-Region (Aminosäuren 124 bis 136) von der weitere Phosphatkontakte (Lys130) ausgehen. Mutationen an der Aminosäure Asn199 haben gezeigt, daß dieser Rest indirekt das Reaktionszentrum der DNA durch eine Änderung der Umgebung des aktiven Zentrums beeinflußt, was wiederum einen Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeit des Enzyms hat [Kim *et al.,* 1996].

1.2.5.3 Der *Inner Arm*

Die Bedeutung der *Inner Arm*-Region, die sich über die Aminosäuren 124 bis 136 erstreckt, wird aus der *Eco*RI-Kokristallstruktur deutlich. Diese zeigt, daß das Enzymdimer die palindrome Erkennungssequenz symmetrisch bindet und die DNA sowohl mit den *Inner* aber auch mit den *Outer Arms* jeder Untereinheit umfaßt. Diese Tatsache deutet auf eine Konformationsänderung des Enzyms während der Substratbindung hin. Eine andere Möglichkeit der DNA-Bindung (Dimerisierung monomerer Untereinheiten am Substrat) konnte durch Ultrazentrifugationsexerimente ausgeschlossen werden. Hier konnte gezeigt werden, daß *Eco*RI häufig sogar in einem multimeren Zustand auftritt, der monomere Zustand in den untersuchten Konzentrationen daher stark unterrepräsentiert ist. [Urbanke, persönliche Mitteilung]. Im monomeren Zustand zeigt *Eco*RI nur noch eine unspezifische Nukleaseaktivität [Vennekohl, 1996].
Das Lysin an der Position 130 soll eine Wasserstoffbrücke mit dem Phosphat des Cytosins der Erkennungssequenz ausbilden [Rosenberg, 1991]. Wie durch Mutageneseexperimente gezeigt werden konnte, liegt jedoch die Hauptaufgabe der beiden positiv geladenen Aminosäuren dieser Region (Lys130 und Arg131) in der lokalen Neutralisation der negativen Ladung des Zuk-

kerphosphatrückgrates [Windolph *et al.,* 1997], während ein direkter Wasserstoffbrückenkontakt eher unwahrscheinlich erscheint.

1.2.5.4 Das β3-Faltblatt

Ein weiterer Anteil an der spezifischen Substraterkennung wird dem β3-Faltblatt zugeschrieben. Es erstreckt sich über die Aminosäuren 103 bis 117, wobei die Aminosäuren Glu111, Lys113, Gln115 und Lys117 für die spezifische DNA-Erkennung beziehungsweise die Katalyse verantwortlich sind (siehe Abbildung 5).

Glu111: Glu111 geht lediglich indirekt durch die Koordination des für die Katalyse essentiellen Magnesiumions in Verbindung mit Asp91 eine Wechselwirkung mit der DNA ein;

Lys113: Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum zu spaltenden Phosphat zwischen dem Guanin und dem Adenin der Erkennungssequenz;

Gln115: Hydrophobe Wechselwirkung zum inneren Thymin der Erkennungssequenz;

Lys117: Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphat zwischen dem Adenin und dem Thymin der Erkennungssequenz.

Durch zielgerichtete Mutageneseuntersuchungen wurde eine Beteiligung der Aminosäure Glu111 in Verbindung mit der Aminosäure Asp91 an der Koordination des Magnesiumions nachgewiesen. Alle Aminosäureaustausche an diesen Positionen wie auch an der Position Lys113 zeigten eine stark erniedrigte, beziehungsweise keine meßbare katalytische Aktivität [Grabowski *et al*., 1995].

Die Bedeutung der Aminosäure Gln115 wurde ebenfalls durch Mutageneseuntersuchungen bestätigt [Jeltsch *et al.,* 1993]. Dieser hydrophobe Kontakt konnte dadurch eindeutig nachgewiesen werden, daß die Eliminierung des Kontaktes sowohl von der Enzymseite her (Mutante Q115A) als auch von der DNA-Seite her (Basenaustasch von Thymin zu Uracil) in der DNA-Bindung und -Katalyse den gleichen Effekt erzeugte. Er ließ sich mit einer Verminderung der Wechselwirkungsenergie um 3kJ/mol quantifizieren. Allerdings gelang diese Bestimmung nur unter *Star*pufferbedingungen, da die Aminosäure Gln115 ebenfalls eine zentrale Stellung in der erwähnten Kopplung der Erkennung mit der Katalyse hat (vergleiche 1.2.4). Dies wird durch

Wasserstoffbrückenbindungen dieser Aminosäure zum Peptidrückgrat des *Extended Chains* und durch seine Stellung direkt neben Aminosäuren des aktiven Zentrums möglich.
Der von Rosenberg postulierte Phosphatkontakt des Aminosäurerestes Lys117 läßt sich in der Hinsicht bestätigen, daß die in unserem Labor untersuchten Mutanten K117L und K117A sowohl in ihrer spezifischen Aktivität, als auch in ihrer Bindungsfähigkeit beeinträchtigt sind [Rosati, persöhnliche Mitteilung].

1.2.5.5 Die α4-Helix

Im direkten Anschluß an das *Extended Chain*-Motiv folgt die α4-Helix, die aus den Aminosäuren 143 bis 157 besteht. Die hauptsächliche Bedeutung dieses Motivs liegt in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen von Arg145 zu beiden Adeninen der Erkennungssequenz, sowie von Lys148 zu dem Phosphat in 5'-Richtung vor der Erkennungssequenz.

Alle unter 1.2.5 aufgeführten Kontakte sind in der Abbildung 5 zusammengefaßt.

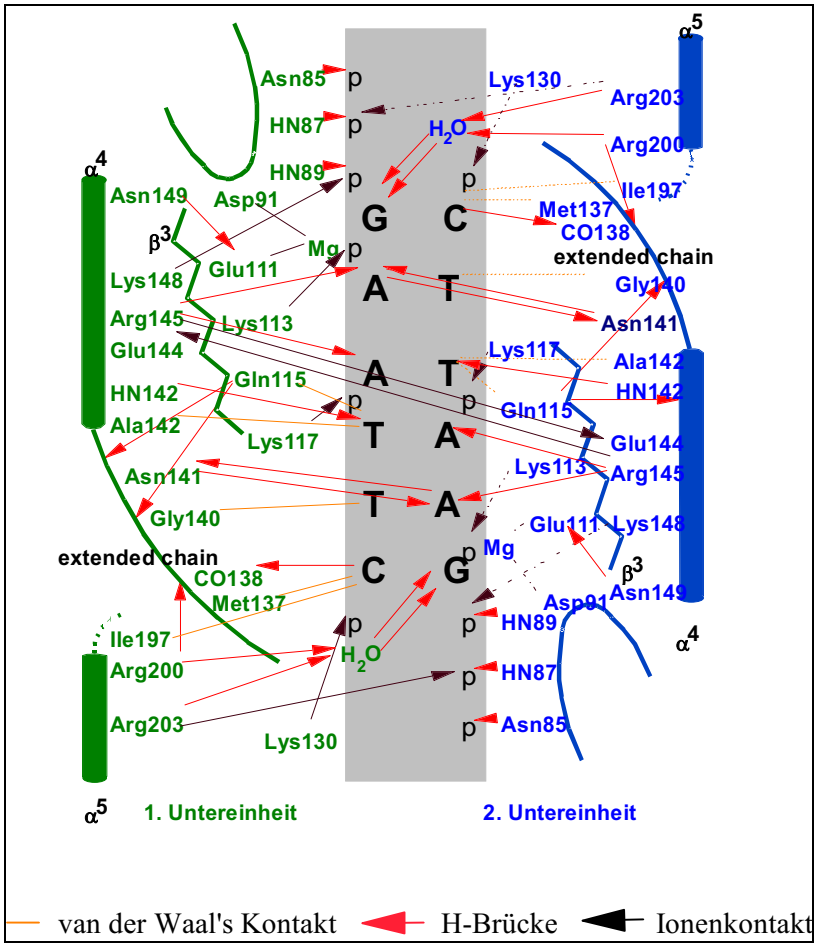

Abb. 5: Schematische Darstellung aller Kontakte beider Untereinheiten von *Eco*RI zur Erkennungssequenz -GAATTC-

1.2.6 Katalyse

Betrachtet man das katalytische Zentrum der Typ II-Restriktionsendonukleasen, so findet sich häufig ein konserviertes Sequenzmotiv der Zusammensetzung PD...(D/E)XK [Thielking *et al*., 1992]. Wie schon unter 1.2 erwähnt, handelt es sich bei diesen Aminosäuren im Fall von *Eco*RI um Pro90, Asp91, Glu111 und Lys113. Nahezu alle Mutageneseuntersuchungen an den Positionen 91 und 113 führen zu einem kompletten Verlust der katalytischen Aktivität [Grabowski *et al.,* 1995]. Dies gilt nicht für Aminosäureaustausche an Position Pro90. Hier wurde lediglich ein Aktivitätsverlust um den Faktor 10 festgestellt. Die Aufgabe des Prolin an der Position 90 wird aufgrund seiner Lage neben dem katalytisch aktiven Aspartat in dessen Positionierung gesehen, besitzt jedoch untergeordneten Charakter [Grabowski *et al*., 1995]. Das vergleichbare Prolin der Restriktionsendonuklease *Eco*RV (Pro73) führt bei einer Substitution durch Glycin beziehungsweise Alanin zu einem drastischen Verlust der Spaltaktivität [Selent *et al*., 1992]. Dieses Phänomen ist auf die für die Positionierung des katalytischen Zentrums wichtige cis-Konfiguration dieses Prolins zurückzuführen. *Bam*HI und *Pvu*II besitzen kein vergleichbares Prolin in räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum. Mutationen an der Position Glu111 der Restriktionsendonuklease *Eco*RI führen zu einem Aktivitätsverlust um den Faktor 10^3 - 10^4 [Grabowski *et al.,* 1995].

Das Auftreten des oben genannten Sequenzmotivs kann als Hinweis für ein katalytisches Zentrum in Restriktionsendonukleasen dienen, wobei jedoch nicht jedes Motiv dieser Art indikativ ist. Außerhalb der oben bereits erwähnten Restriktionsenzyme ist das Sequenzmotiv erst bei *Mun*I [Siksnys *et al*., 1994; Lagunaritius & Siksnys, 1997], *Fok*I [Waugh & Sauer, 1993] und der *Homing*endonuklease I-*Ppo*I [Wittmeyer & Raines, 1998] durch Mutagenesestudien als katalytisches Zentrum nachgewiesen worden.

1.2.6.1 Mechanismus der Reaktion

Der grundsätzliche Mechanismus der DNA-Spaltung beinhaltet, daß ein aktiviertes Wassermolekül eine Phosphodiesterbindung in einer S_N2-Reaktion hydrolysiert [Connolly *et al*., 1984; Jeltsch *et al.,* 1993a]. Der Angriff erfolgt von der 3'-Seite aus und ergibt ein 5'-Phosphat. Dieser Mechanismus benötigt eine Lewis-Säure, um die Elektrophilie des Phosphoratoms zu erhöhen, sowie eine Base, die das angreifende Wassermolekül aktiviert, indem sie die negative Partialladung des Sauerstoffmoleküls erhöht. Ferner werden eine weitere Lewis-Säure zur Stabilisierung des pentakovalenten Phosphors im Übergangszustand sowie eine Brönsted-Säure zur Protonierung der Fluchtgruppe benötigt (siehe Abbildung 6). Die Rolle der Stabilisierung

der negativen Fluchtgruppe wird dem Mg^{2+}-Ion zugeschrieben, wobei Lys113 vermutlich unterstützende Wirkung zeigt. Die postulierten Mechanismen der Katalyse stellen sich nun folgendermaßen dar:

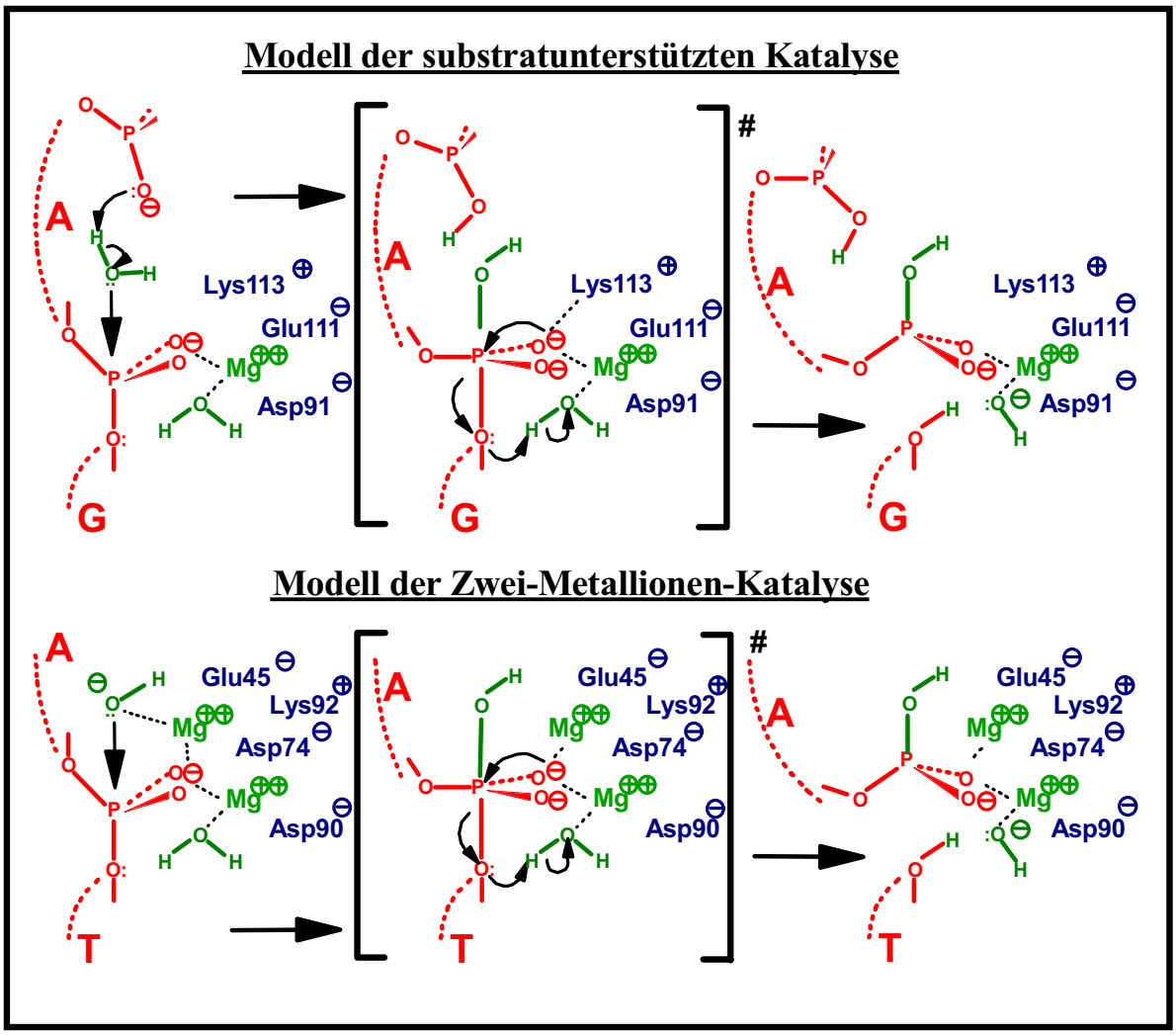

Abb. 6: Postulierte Katalysemechanismen im Vergleich

Basierend auf Strukturdaten [1ERI, in der Brookhaven Data Bank], *Molecular Modeling* [Jeltsch *et al.*, 1992] und gerichteten Mutageneseuntersuchungen [Grabowski *et al.*, 1995] konnte gezeigt werden, daß Mg^{2+} sowohl eine Wechselwirkung mit der DNA (O-Atome des Phosphats), als auch mit den Aminosäureseitenketten von Asp91 und Glu111 von *Eco*RI eingeht. Die Rolle der Aktivierung des Wassermoleküls wird, aufgrund einer fehlenden geeigneten Aminosäure in diesem Bereich des Enzyms dem pro-R_P-Phosphorylsauerstoff der Phosphatgruppe zugeschrieben, die auf der 3'-Seite der zu spaltenden Bindung folgt. Eine negative Ladung an diesem Sauerstoffatom ist für die Katalyse essentiell, da es durch die Aktivierung des Wassermoleküls dessen Nukleophilie erhöht [Jeltsch *et al.*,1993b]. Der Mechanismus wurde

durch Spaltexperimente von sogenannten *Missing Phosphate*-Substraten, denen das 3' zu der zu spaltenden Bindung die Phosphatgruppe fehlt, belegt [Jeltsch *et al.,* 1993a]. Diesen Substraten fehlt, für die keine Spaltung erzielt werden konnte.

Im Gegensatz zu *Eco*RI existiert für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV ein Protein/DNA-Kokristall mit den zweiwertigen Kationen Mg^{2+}, Mn^{2+} und/oder Ca^{2+}. In diesen DNA-Kokristallen konnten teilweise zwei Metallionen-Bindungsstellen, die sich im katalytischen Zentrum befinden, bestimmt werden. Die an den Wechselwirkungen zum Kation beteiligten Aminosäuren waren dabei Asp74/Asp90, die eine hohe Elektronendichte aufwiesen und Asp74/ Glu45, mit einer geringeren Elektronendichte. Diese zweite Bindungsstelle erfüllt nicht alle Kriterien für eine Magnesiumbindungsstelle. Die Existenz einer zweiten Bindungsstelle wurde jedoch durch biochemische Experimente belegt. Hier wurde in Gegenwart von Mn^{2+} durch Zugabe von Ca^{2+} die Spaltgeschwindigkeit erhöht, obwohl Ca^{2+} als alleiniges zweiwertiges Kation die Reaktion nicht vermittelt [Vipond *et al*., 1995]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell der zwei Metallionen-Katalyse [Kostrewa & Winkler, 1995; Vipond *et al*., 1995] als alternatives Modell zur substratunterstützten Katalyse (siehe Abbildung 6) postuliert. In diesem Mechanismus wird das angreifende Wassermolekül durch eines der beiden Metallionen aktiviert, wobei das zweite Ion auch hier die zu spaltende Bindung polarisiert. Das angreifende Wasser entstammt vermutlich der Hydrathülle des zweiten Metallions. Der Ablauf der Katalyse ist noch nicht eindeutig geklärt, wobei jedoch viele Hinweise gegen eine Zwei-Metallionen-Katalyse sprechen:

- Der Mechanismus spricht dem Glu45 eine zentrale Rolle zu, die jedoch durch zielgerichtete Mutageneseuntersuchungen widerlegt werden konnte [Selent *et al*., 1992].
- Es erscheint unmöglich, daß das die Phosphodiesterbindung angreifende Wassermolekül aus der Hydrathülle des zweiten Metallions (Glu45/Asp74) stammt, da die Entfernung zwischen beiden Zentren 0,89nm beträgt.
- Für andere Restriktionsendonukleasen (*Pvu*II und *Eco*RI) ist ein Zwei-Metallionen-Mechanismus unmöglich, da sich die möglichen Bindungspartner für ein zweites Metallion (*Eco*RI: Asp59, *Pvu*II: Glu55) als katalytisch unwichtig erwiesen (Grabowski *et al*., 1996; Nastri *et al*., 1997).

Für alle vier kristallisierten Restriktionsenzyme konnte in Spaltexperimenten mit Phosphonat-substituierten Substraten die negative Ladung des aktivierten Phosphats als für die Katalyse essentiell nachgewiesen werden [Jeltsch *et al*., 1993a 1995]. Nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse sind Konformationsänderungen der DNA zwingend erforderlich. Diese

Konformationsänderungen sind nötig, um das aktivierte Phosphat circa 1Å näher an das anzugreifende Phosphat zu bringen [Jeltsch, 1992]. Das Modell erweitert ferner die Vorstellungen über die unter 1.2.5 erwähnte Kopplung zwischen Erkennung und Katalyse. Diese Kopplung verläuft demnach nicht nur über Konformationsänderungen im Enzym sondern auch in der DNA (*Induced Fit*).

1.3 Ziel der Arbeit

Eine der faszinierensten Fragen der heutigen Molekularbiologie befaßt sich mit den molekularen Details der individuellen DNA-Erkennung bestimmter Enzyme. Ein wichtiger Schritt in der Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen wäre die Aufstellung eines einfachen Schemas ihrer Interaktionen, um anschließend einen generellen „Erkennungscode“ zu entwikkeln. In den vergangenen Jahren hat sich jedoch gezeigt, daß selbst innerhalb der Enzymart der Restriktionsendonukleasen, trotz evolutionärer Zusammenhänge, die spezifische DNA-Erkennung einer Vielzahl von verschiedenen individuellen Wechselwirkungen entspringen, deren spezielle Arten und Eigenschaften es zu untersuchen gilt.

Wie unter 1.2.2 erwähnt, stellen hydrophobe Wechselwirkungen einen wesentlichen Bestandteil der sequenzspezifischen Erkennung der Restriktionsendonuklease *Eco*RI dar [Heitmann, 1992]. Basierend auf Röntgenstrukturdaten wurden folgende Aminosäuren für einen hydrophoben Kontakt zur Erkennungssequenz verantwortlich gemacht: Gln115, Met137, Gly140, Ala142 sowie Ile197 [Rosenberg, 1991]. Die Existenz des hydrophoben Kontaktes zwischen Gln115 und der Methylgruppe des inneren Thymins der Erkennungssequenz ist bereits durch Spaltexperimente mit Mutanten an Position 115 belegt worden [Jeltsch *et al.,* 1993]. Erste Hinweise von Spaltexperimenten mit Mutanten, die einen Aminosäureaustausch an der Position 197 besitzen, deuten darauf hin, daß der postulierte Kontakt nicht wichtig für die sequenzspezifische Erkennung von *Eco*RI ist, wahrscheinlich sogar überhaupt nicht ausgebildet wird [Küster, 1995].

Ziel dieser Arbeit ist es, die in meiner Diplomarbeit bereits erhaltenen Ergebnisse von Mutanten an der Position 197 mit dem Aminosäureaustausch nach Alanin und anschließenden Spalt- und Bindungsexperimenten zu manifestieren und damit einen postulierten Kontakt endgültig zu widerlegen. Weiterhin sollen mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese alle potentiellen hydrophoben Kontakte der Restriktionsendonuklease *Eco*RI mit ihrer Erkennungssequenz, mit Ausnahme der bereits untersuchten Position Gln115, betrachtet werden. Dadurch werden weitere Er-

kenntnisse über Protein-DNA-Wechselwirkungen erwartet, die anschließend zu einer Änderung der Sequenzpräferenzen in Abhängigkeit von flankierenden Sequenzen bis hin zu einer Erweiterung der Sequenzspezifität führen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

In den verschiedenen Arbeitsschritten werden folgenden Stämme, die alle Abkömmlinge des Stammes K12 sind, eingesetzt:

LK111(λ):

Genotyp: $r_k^- m_k^+$, *thi*-1, *thr*-1, *leu*B6, *ton*A21, *sup*E44, *lac*I^{q}YZΔM15, *Hfr*, λ^+.

Hierbei handelt es sich um einen λ-lysogenen Stamm, der den λ-Repressor *c*I konstitutiv exprimiert. Dadurch werden vom P_L-Promotor kontrollierte Gene reprimiert. Verwendung findet der Stamm in der Vermehrung von Plasmid-DNA [Zabeau *et al.,* 1982].

WK6mutS(λ):

Genotyp: $r_k^- m_k^+$, *Δ[lac pro*AB*], gal*E, *str*A, *mut*S215*: Tn10 [F', pro*AB, *lac*I^{q}ZΔM15*]*, λ^+.

Dieser λ-lysogene Stamm reprimiert den P_L-Promotor und wird zur Transformation in der *Gapped Duplex*-Mutagenese (vergleiche Kapitel 2.2.1.1) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen reparaturdefizienten Stamm, bei dem das für die *Mismatch*-Reparatur verantwortliche *mut*S-Gen durch Tn10 zerstört wurde. Somit wird die Reparatur von Basenfehlpaarungen verhindert [Zell *et al.,* 1987].

TGE900(pEcoR4):

Genotyp: $r_k^- m_k^-$, *su*-1, *ilv*-1, *bio[λcI857ΔBamHI].*

Dies ist ebenfalls ein λ-lysogener Stamm, der jedoch eine temperatursensitive Mutante des λ-Repressors (*c*I857) exprimiert. Oberhalb von 37°C liegt dieser Repressor als bindungsinaktives Monomer vor, so daß eine Expression plasmidkodierter Gene, die unter der Kontrolle des P_L-Promotors stehen, durch Temperaturerhöhung induziert werden kann [Bottermann & Zabeau, 1985]. Ferner enthält der hier verwendete Stamm das Plasmid pEcoR4. Dieses Plasmid kodiert für die zu *Eco*RI korrespondierende Methylase und verhindert so die toxische Wirkung des exprimierten Genprodukts *Eco*RI [Bottermann & Zabeau, 1985].

2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Präparation kompetenter Zellen erfolgt nach Chung *et al*. (1989) oder nach der RbCl-Methode, einer modifizierten Vorschrift nach Hannahan (1983), die hier beschrieben werden soll. Die RbCl-Methode eignet sich zur Transformation für nahezu alle Plasmide und erreicht Kompetenzen von etwa 10^7cfu pro µg pBR322. Die kompetenten Zellen können bis zu ein Jahr bei -70°C gelagert werden.

Eine Über-Nacht-Kultur wird 1:100 in Luria-Bertani-Medium (LB) verdünnt und nach Zusatz von 20mM $MgSO_4$ bebrütet, bis die Zellen in der frühlogarithmischen Wachstumsphase (OD_{600}: 0,4 bis 0,6) sedimentiert (Zentrifuge: Firma Heraeus, Sepatech, Cryofuge 8500) werden können. Das Zellpellet wird in 0,4 Volumenanteilen TFB1 resuspendiert. Die folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt. Die Lösung wird für 5min auf Eis inkubiert und anschließend für 5min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1/25 des Orginalvolumens TFB2 resuspendiert und zu je 100µl-Fraktionen aliquotiert. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

LB (Luria-Bertani)-Medium:

10g Caseinhydrolysat (Gibco-BRL)
10g Hefeextrakt (Gibco-BRL)
5g NaCl
ad 1l ddH_2O; pH 7,5 einstellen

TFBI:

30mM KAc
100mM RbCl
10mM $CaCl_2$
50mM $MnCl_2$
15% Glycerin
pH 5,8; einstellen mit 0,1M Essigsäure und sterilfiltrieren

TFB2:

10mM MOPS oder PIPES
75mM $CaCl_2$
10mM RbCl
15% Glycerin
pH 6,5; einstellen mit 0,1M KOH und sterilfiltrieren

2.1.3 Transformation

Ein 100µl-Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 bis 5µl DNA-Lösung (0,1-10ng) versetzt und 45min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2min bei 42°C und eine Inkubation von weiteren 2min auf Eis. Dieser Ansatz wird dann mit dem 10fachen Volumen LB-Medium verdünnt und für 45min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden anschließend auf Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im bebrütet (Ampicillin: 100µl im Flüssigmedium, 75µg/ml im Festmedium; Chloramphenicol: 30µg/ml im Flüssigmedium, 20µg/ml im Festmedium). Der Stamm TGE900 (pEcoR4) wird zur Transformation mit pRIF309+ einem moderaten Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt und anschließend bei 30°C bebrütet, um die vorzeitige Expression der Restriktionsendonuklease zu verhindern.

2.1.4 Vektoren

Es werden in dieser Arbeit folgende kommerziell erhältliche beziehungsweise als Laborpräparationen vorliegende Vektoren benutzt:

– **pBR322**:

Das Plasmid in dieser Arbeit als *Template* zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten, die als Substrate in den Gel-Retardations-*Assay* (siehe 2.5.1) eingesetzt werden. Es besteht aus dem *ori*- und *rop*-Gen-Anteil des ColE1-Derivates pMB1. Ferner enthält das Plasmid das Tetracyclin-Resistenzgen aus pSC101 und das Ampicillin-Resistenzgen des Transposons Tn3.

– **pEcoR4**:

Das Plasmid pEcoR4 ist ein Abkömmling von pACYC184, dessen p15A-Replikon es trägt. Es ist zu pRIF309+ kompatibel und exprimiert konstitutiv neben der Chloramphenicolacetyltransferase das *ecoRI*-Methylase-Gen, wodurch in Verbindung mit pRIF309+ die Überexpression des toxischen *ecoRI*-Genproduktes ermöglicht wird. Die Chloramphenicol-Resistenz wird als Selektionsmarker genutzt.

– **pRIF309+** (Wolfes *et al*., 1986):

Der Phagemidvektor pRIF309+ ist ein Derivat des Plasmids pBR322. Er besitzt einen bakteriellen ColE1-Replikationsursprung zur Herstellung einer doppelsträngigen Kopie. Ferner liegt ein Replikationsursprung des filamentösen Bakteriophagen f1 zur Erzeugung einer einzelsträn-

gigen Kopie vor. pRIF309+ trägt das β-Lactamasegen, welches durch den Tn903-Tet^R-Promotor konstitutiv exprimiert wird. Die plasmidhaltigen Zellen verfügen daher über eine Ampicillinresistenz.

Das *ecoRI*-Gen wird durch den P_L-Promotor des Phagen λ und den fd-Terminator kontrolliert [Wolfes *et al*., 1986]. Dieses System ist zur Expression toxischer Genprodukte gut geeeignet. Das Plasmid kann in den λ-Repressor *c*I produzierenden *E.coli*-Stämmen gehalten werden.

Das Plasmid wird in dieser Arbeit als *Template* in der PCR-Mutagenese (siehe 2.2.1.2) eingesetzt.

– **pRIF309+(His_6)** (Rotzal, 1992):

Das in dieser Arbeit zur Herstellung und Expression von *Eco*RI-Mutanten verwendete Plasmid entspricht weitgehend pRIF309+. Es besitzt zusätzlich jedoch die kodierende Sequenz für für sechs Histidine am C-Terminus des Endonukleasegens, so daß das Genprodukt über eine Ni-NTA-Affinitätsmatrix aufgereinigt werden kann.

– **pUC8** (Vieira & Messing, 1982; Pouwels *et al*., 1985):

Hierbei handelt es sich um einen käuflichen Klonierungsvektor mit einem ColE1-Replikationsursprung, der ein Ampicillin-Resistenzgen trägt. Das Plasmid hat eine Größe von 2665 Bp. Es besitzt eine singuläre *Eco*RI-Schnittstelle innerhalb der *Multicloningsite*, die in dieser Arbeit für kinetische Untersuchungen herangezogen wird.

– **pUC*Eco*RND** und Derivate (Oelgeschläger, 1992):

Hierbei handelt es sich um einen Plasmid*pool* von 4096 unterschiedlichen pUC-Derivaten, die sich bezüglich der drei, die Erkennugssequenz von *Eco*RI 5' beziehungsweise 3' umgebenden Basen unterscheiden. Mit diesem Plasmid*pool* als Substrat wurde eine Spaltung durch die Mutante M137Q/N141A durchgeführt (Windolph, *et al*., 1997).

2.2 Molekularbiologische Methoden

Standardanalysetechniken (Restriktionsspaltungen, DNA-Sequenzierung, diverse Gelelektrophoresen) wurden wie bei (Grabowski, 1993; Windolph, 1996 und Küster, 1995) beschrieben durchgeführt. Zur Präparation von Plasmid-DNA in unterschiedlichem Maßstab, Aufreinigung von phosphorylierten Oligonukleotiden, PCR-Produkten sowie zur Isolierung von DNA aus

Agarosegelen wurden *Kits* der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller eingesetzt.

2.2.1 Mutagenesestrategien

Zur Herstellung von Einzelmutationen wurde die *Gapped Duplex*-Methode [Kramer *et al*., 1984] angewendet. Alle Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten wurden mittels PCR-Mutagenese [Barettino *et al*., 1993] hergestellt.

2.2.1.1 *Gapped Duplex*-Mutagenese

Auf eine einzelsträngige Plasmid-DNA von pRIF309+(His_6), das nach Superinfektion der plasmidhaltigen Bakterienzelle mit f1-Phagen erhalten wurde (beschrieben in: Vennekohl, 1996), wird ein komplementärer Mutagenese*primer,* der die einzuführende Mutation trägt, hybridisiert. Neben der gewünschten Mutation befindet sich zusätzlich auf dem Mutagenese*primer* eine stille Mutation, die den Wegfall oder die Entstehung einer Restriktionsspaltstelle bewirkt, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Diese Spaltstelle dient zur ersten Überprüfung des Mutageneseerfolges und wird als *Screeningsite* bezeichnet (siehe Abbildung 7). Um ungewünschte Mutationen während der Auffüllreaktion (*Fill In*) zu vermeiden, ist der auf dem Plasmid aufzufüllende Bereich möglichst klein zu halten. Dies wird dadurch erreicht, daß ein Mutageneserahmen, der aus dem doppelsträngigen Vektor durch Spaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen erhalten wird, ebenfalls auf die einzelsträngige Matrize hybridisiert wird. Mit dem Hybrid-Plasmid wird im Anschluß an eine Ligationsreaktion zur Manifestation der eingeführten Mutationen der reparaturdefiziente Stamm WK6mutS(λ) transformiert (siehe 2.1.3). Aufgrund der Tatsache, daß nur ein Strang des Plasmids den durch den Mutagenese*primer* erzeugte *Mismatch* trägt, besitzen nach der *in vivo* Amplifikation nur 50 % der Tochterplasmide die gewünschte Mutation.

Um beide Plasmidsorten voneinander zu trennen, erfolgt eine Spaltung der gewonnenen DNA durch das *Screening*enzym mit einer anschließenden Auftrennung auf einem Agarosegel. Wurde eine Restriktionsspaltstelle eingeführt, so ist nach der Restriktionsspaltung und anschließender Gelelektrophorese die linearisierte Bande zu isolieren, zu religieren und damit LK111(λ) zu transformieren, während bei der Entfernung einer Spaltstelle die nach der Spaltung verbleibende *supercoiled*-DNA direkt transformiert werden kann. Nach einer Charakterisierung

von Einzelklonen aus LK111(λ) durch einen erneuten Restriktionsverdau, erfolgt zunächst die Sequenzierung über den zu mutierenden Bereich und anschließend über das gesamte *ecoRI*-Gen. Der Ablauf der *Gapped Duplex*-Mutagenese ist in Abbildung 7 dargestellt.

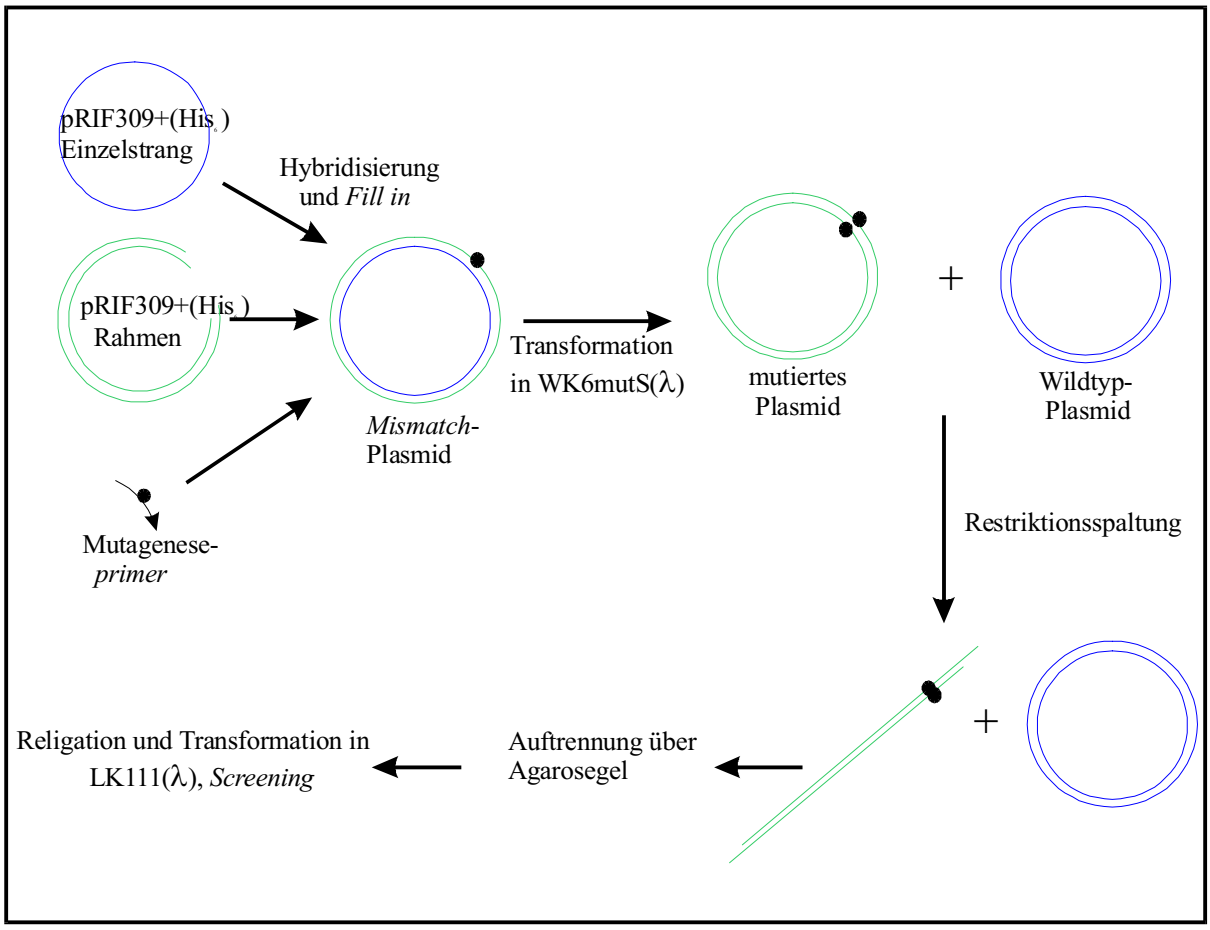

Abb. 7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der *Gapped Duplex*-Mutagenese bei Einführung einer Restriktionsspaltstelle

Der Ablauf der *Random*mutagenese stellt sich analog dem der *Gapped Duplex*-Mutagenese dar. Der Unterschied besteht hier in der Verwendung eines *Primer*gemisches als Mutagenese-*primer*.

Hybridisierungspuffer: 10mM Tris/HCl, pH 7,5; 150mM KCl

Fill In-Puffer: 27,5mM Tris/HCl, pH 7,5; 67,5mM KCl; 15mM $MgCl_2$; 2mM DTE; 50µM ATP; je 25µM dATP, dTTP, dGTP, dCTP

2.2.1.2 PCR-Mutagenese

Die von Mullis entwickelte *in vitro*-Amplifikationsmethode der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [Mullis & Falcona, 1989] ermöglicht hier die gezielte Veränderung des *ecoRI*-Gens, in das durch die Verlängerung der eingesetzten mutagenen *Primer* gleichzeitig eine Mutation auf beiden Strängen des Gens eingebracht wird [Barettino *et al.,* 1993]. Die Mutagenesestrategie besteht aus zwei PCR-Reaktionen, die in der Abbildung 8 dargestellt sind. In der 1. PCR-Reaktion werden sowohl der Mutagenese*primer* als auch der Rück*primer* A eingesetzt. Der Mutagenese*primer* beinhaltet die zum Ausgangssubstrat gewünschte Veränderung, der Rück*primer* A ist ein dem His_6-*tag* komplementäres DNA-Fragment. Als *Template* wird hier pRIF309+(His_6) eingesetzt. Das Produkt der 1. PCR-Reaktion, dessen Länge von der Lage des jeweiligen Mutagense*primers* abhängig ist, dient in der anschließenden 2. PCR-Reaktion als Mega*primer*. In Kombination mit dem Hin*primer* B ergibt sich ein Produkt, welches das gesamte veränderte *ecoRI*-Gen beinhaltet. Um eine nahezu 100%ige Mutageneseausbeute zu erhalten, findet in der 2. PCR pRIF309+(ohne His_6) als *Template* Verwendung. Durch den Einsatz zweier verschiedener *Templates* ist in der 2. PCR-Reaktion die Hybridisierung des Rück*primers* A nicht auf dem *Template,* sondern nur auf dem Mega*primer* möglich. Die Mutageneseausbeute wird lediglich durch die lineare Amplifikation des *Templates* durch die Hybridisierung von Hin*primer* B auf dem Ausgangs*template* keine 100% erreichen. Diese Nebenreaktion kann durch Verwendung niedriger *Template*konzentrationen gering gehalten werden. Im Verlauf der PCR-Reaktion nimmt die Hybridisierung von Hin*primer* B auf dem *Template* durch zunehmende Konzentrationen des verlängerten Mega*primers* ab.

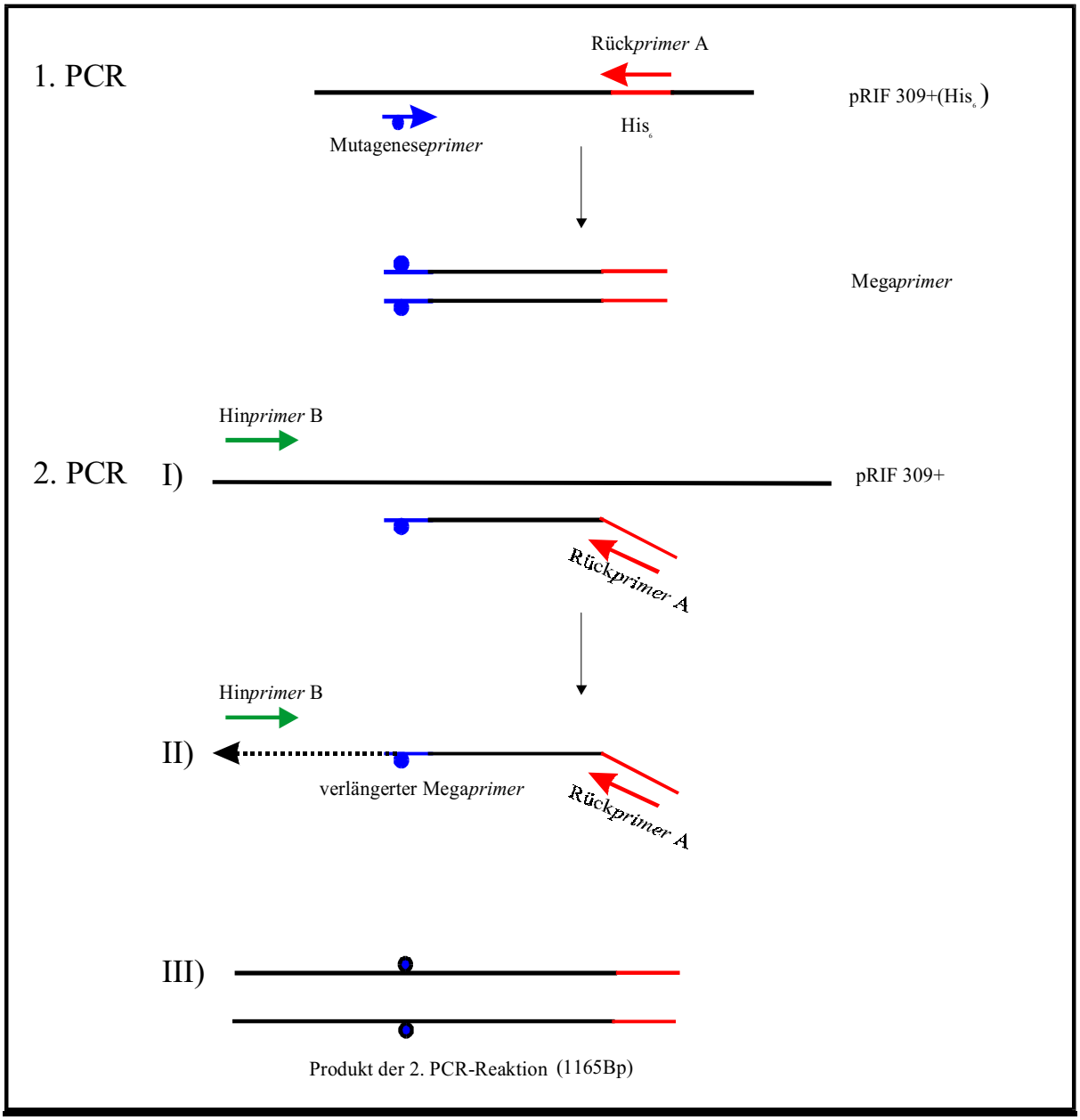

Abb. 8: Ablauf der Teilschritte der PCR-Mutagenese. Die Bildung des Mega *primers* erfolgt in der 1. PCR. In der 2. PCR-Reaktion wird zunächst der Mega *primer* zur vollständigen Produktlänge verlängert. Im Anschluß daran findet in Kombination mit Hin *primer* B eine exponentielle Amplifikation des gesamten Genbereichs statt

Der Vorteil dieser Methode liegt im Vergleich zur *Gapped Duplex*-Mutagenese sowohl in einem deutlich geringeren Zeitaufwand, als auch in der Möglichkeit der Herstellung von Mehrfachmutanten, deren Mutationen in der Primärsequenz dicht aufeinander folgen. Hier ist es mit Hilfe der *Gapped Duplex*-Mutagenese schwierig, mehrere Mutationen über einen einzigen Schritt einzubringen, da der Mutagenese*primer* mit jedem zusätzlichen *Mismatch* schlechter auf dem *Template* hybridisiert. Eine schlechte Anlagerung des Mutagenese*primers* in der Hybridisierungsphase, ermöglicht in der anschließenden Auffüllreaktion der T7 DNA-Polymerase durch ihre 5', 3'-Exonukleaseaktivität, unvollständig hybridisierte Bereiche abzuspalten

(Küster, 1995). So ist es häufig unumgänglich, eine erneute zeitaufwendige DNA-Einzelstrang-präparation einer Einzelmutante herzustellen, um in einer weiteren Mutagenese die gewünschte Doppelmutante zu erhalten. Dieses Problem tritt ebenfalls auf, wenn zwischen den einzelnen Mutationsstellen im *ecoRI*-Gen keine Schnittstelle auftritt, wodurch eine Doppelmutante aus den entsprechenden Einzelmutanten in einem Klonierungsschritt hergestellt werden könnte. In der PCR-Mutagenese kann die gewünschte Doppelmutante durch Einsatz der entsprechenden Einzelmutante als *Template* in der 1. PCR-Reaktion erhalten werden, was mit einem deutlich geringeren Zeitaufwand verbunden ist.
Folgende *Primer*sequenzen wurden für die PCR-Mutagenese eingesetzt:

Name des *Primers*	Sequenz
Hin*primer* B	ACGAGGCAGACCTCAGCGCCGGTG
Rück*primer* A	GTGATGGTGATGGTGATGCTTACTA

Ansatz der 1. PCR-Reaktion:

0,5 µl	pRIF309+(His_6) (50ng/µl, *Sca*I linearisiert)
5µl	2mM dNTPs
1µl	2µM Rück*primer* A
1µl	2µM Mutagenese*primer*
1µl	*Pfu DNA*-Polymerase (nativ, 2,5U/µl, Firma Stratagene)
5µl	10 x *Pfu*-Puffer
35,5µl	dd H_2O

Um den entstandenen Mega*primer* vom *Template* abzutrennen, ist eine Aufreinigung über ein Agarosegel erforderlich, wobei die entstandene Produktbande ausgeschnitten und mit dem Qiaquick-Gel-*Extraction*-Kit der Firma Qiagen isoliert wird. Die DNA wird in 50µl TE aufgenommen.

TE: 10mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1M EDTA

Ansatz der 2. PCR-Reaktion:

5µl	aufgereinigter Mega*primer*
1µl	2µM Hin*primer* B
1µl	2µM Rück*primer* A
0,5µl	pRIF309+ (50ng/µl, *Sca*I linearisiert)
5µl	2mM dNTPs
1µl	*Pfu DNA*-Polymerase (2,5U/µl)
5µl	10 x *Pfu*-Puffer
35,5µl	ddH_2O

PCR-Bedingungen für die 1. und 2. PCR:

	Temperatur [°C]	Wechselzeit [°C/s]	Reaktionszeit [s]
Denaturierung 1 x	91	3	300
Amplifikation 30 x	52	3	90
	68	3	60
	91	3	60
abschließende Extension 1 x	52	3	90
	68	3	360

In beiden PCR-Reaktionen wird die *Pfu DNA*-Polymerase eingesetzt, um eine möglichst hohe Synthesegenauigkeit zu erzielen. Die Einbaugenauigkeit von *Pfu DNA*-Polymerase liegt durch ihre *Proofreading*-Aktivität bei 1/6000, wohingegen die Mutationsfrequenz der *Taq DNA*-Polymerase mit 1/500 pro Zyklus beschrieben wurde (Saiki *et al.,* 1988).

Die *Template*-DNA wurde in linearisierter Form eingesetzt. Die Linearisierung erfolgte mit diversen Restriktionsendonukleasen, die ihre Spaltstelle außerhalb des *ecoRI*-Gens besitzen.

Die Aufreinigung des 1. PCR-Produktes zur Abtrennung von Nukleotiden und Enzymen erfolgt über PCR-*Spin*-Säulen der Firma Qiagen. Das PCR-Produkt der 2. PCR-Reaktion (1165Bp) wird mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII und *Asu*II gespalten, wobei eine an-

schließende Aufreinigung über ein 1,2%iges Agarosegel erfolgt. Die Extraktion aus dem Agarosegel erfolgt nach dem Qiaquick-*Purification*-Protokoll. Im Anschluß wird das durch diese Kombinationsspaltung entstandene 538Bp große Fragment mit einem entsprechend gespaltenen Rahmen (*Hin*dIII/*Asu*II) ligiert (siehe 2.2.3) und damit TGE900(pEcoR4) transformiert.

Pfu-Puffer: 20mM Tris/HCl, pH 8,2; 10mM $(NH_4)_2SO_4$; 2mM $MgCl_2$; 100µg/ml BSA; 0,1% Triton X-100

2.2.1.3 Mutagenese*primer*

Die hier angegebenen *Primer*sequenzen sind in der 5'→3'-Richtung angegeben. Die Basenpaare, die den gewünschten Aminosäureaustausch codieren sind fett gedruckt. Basenaustausche, die die Einführung beziehungsweise Entfernung einer *Screening*spaltstelle bewirken, jedoch keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz besitzen, sind unterstrichen.

Aminosäureposition Histidin 114:

H114T	GCT GAA GCC AAA**ACG** CAA GGT AAA GAT ATT ATA AAT (-*Sty*I)

In dieser Mutagenese konnte die Spaltstelle für *Sty*I direkt durch Einführung der Mutation zerstört werden. Der Aminosäureaustausch H114T wurde durchgeführt, da er im folgenden in Kombination mit zwei beziehungsweise drei weiteren Aminosäureaustauschen untersucht werden sollte.

Aminosäureposition Methionin 137:

M137A	CAA GAT TTA **GCG** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT ATA (*Bgl*II)
M137E	GGA GAT CAA GAT TTA **GAG** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (*Bgl*II)
M137H	GGA GAT CAA GAT TTA **CAC** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (*Bgl*II)
M137I	CAA GAT TTA **ATA** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT ATA (*Bgl*II)
M137Q	GGA GAT CAA GAT TTA **CAG** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (-*Bgl*II)
M137R	GGA GAT CAA GAT TTA **AGG** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (-*Bgl*II)
M137S	GGA GAT CAA GAT TTA **NNG** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (-*Bgl*II)
M137Y	GGA GAT CAA GAT TTA **TAC** GCT GCT GGT AAT GCT ATC GAA<u>AGG TCT</u> CAT AAG AAT (-*Bgl*II)

Die Mutante M137S wurde durch eine *Random*mutagenese erhalten. Wie anhand ihres Mutagenese*primers* zu sehen ist, sind hier die ersten beiden Basen des Codons für Methionin durch N (alle vier möglichen Basen werden an dieser Position synthetisiert) ersetzt, wodurch 16 verschiedene Basenkombinationen an diesen beiden Positionen entstehen können. Innerhalb dieser Mutagenese wurden lediglich zusätzlich die Mutante M137G und bereits durch zielgerichtete Mutagenese erhaltene Mutanten hergestellt. Auf eine Proteinexpression der Mutante M137G wurde jedoch verzichtet, da die Mutante M137A zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig charakterisiert war und von der Charakterisierung der Mutante M137G keine neuen Erkenntnisse erwartet wurden.

Aminosäureposition Glycin 140:

G140A	ATG GCT GCT **GCT** AAT GCT ATC GAA<u>CGT TCT</u> CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)
G140S	ATG GCT GCT **AGT** AAT GCT ATC GAA<u>CGT TCT</u> CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)

Aminosäureposition Alanin 142:

A142G	ATG GCT GCT GGT AAT**GGT** ATC GAACGT TCT CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)
A142D	ATG GCT GCT GGT AAT**GAT** ATC GAACGT TCT CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)
A142N	ATG GCT GCT GGT AAT**AAT** ATC GAACGT TCT CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)
A142S	ATG GCT GCT GGT AAT**AGT** ATC GAACGT TCT CAT AAG AAT ATA TCA (-*Bgl*II)

Aminosäureposition Isoleucin 197:

I197A	AAT TCT GGT**GCA** TTA AAT AGG TTA GATCGG TTA ACT GCA G (+*Hpa*I)

Doppelmutanten an den Positionen Methionin 137, Asparagin 141 oder Alanin 142:

M137Q/N141A	GGA GAT CAA GAT TTA**CAG** GCT GCT GGT**GCT** GCT ATC GAAAGG TCT CAT AAG AAT (-*Bgl*II)
M137Q/A142G	GGA GAT CAA GAT TTA**CAG** GCT GCT GGT AAT**GGT** ATC GAAAGG TCT CAT AAGAAT (-*Bgl*II)
M137R/A142G	GGA GAT CAA GAT TTA **MRG** GCT GCT GGT AAT**GGT** ATC GAA AGG TCT CAT AAG (-*Bgl*II)

Die Mutante M137R/A142G ist das Produkt einer *Random*mutagenese deren Ziel es war, diverse Substitutionen an der Position 137 in Kombination mit dem Aminosäureaustausch A142G durchzuführen. Dazu wurde ein *Primer*gemisch synthetisiert, das an den in Klammern geschriebenen Positionen die beiden Basen (M: A,C und R: A,G) zu gleichen Teilen beinhaltet. Die Dreifachmutante M137Q/N141A/I197A und die Vierfachmutante H114T/M137Q/N141A/I197A wurden durch PCR-Mutagenese hergestellt. Daher ist hier die Synthese eines neuen Mutagenese*primers* nicht nötig gewesen. Die Dreifachmutante M137Q/N141A/I197A wurde auf der Basis der Doppelmutante M137Q/N141A, die in der PCR-Mutagenese als *Template* eingesetzt wurde, hergestellt. Als zweiter *Primer* dient hier der Mutagenese*primer* der Mutante I197A. Die Vierfachmutante H114T/M137Q/N141A/I197A wurde ebenfalls in einer

PCR-Mutagenese hergestellt. Hier wurde die Dreifachmutante M137Q/N141A/I197A als *Template* verwendet und der Mutagenese*primer* H114T eingesetzt.

2.2.2 DNA-Sequenzierung

Eine erfolgreich eingebrachte Mutation wurde jeweils durch Sequenzierung bestätigt. Um eventuell auftretende Sekundärmutationen auszuschließen, wurde das gesamte *ecoRI*-Gen sequenziert.

Die Sequenzierung von DNA-Bereichen wurde nach der Didesoxynukleotid-Methodemit T7 DNA-Polymerase durchgeführt [Sanger *et al.,*1977].

Auf die zu sequenzierende DNA (*Template*) wird vor der Sequenzierung ein kurzes Oligonukleotid (*Primer*) hybridisiert (*Annealing*), welches durch die DNA-Polymerase, die den zu untersuchenden Bereich kopiert, verlängert wird. Zusätzlich zu den Desoxynukleotidtriphosphaten (eines der Desoxynukleotidtriphosphate wird zu einem bestimmten Anteil radioaktiv markiert eingesetzt) wird in vier Parallelreaktionen je eine der vier Basen als Didesoxynukleotidtriphosphat, als Monomerbaustein für die Polymerisation eingesetzt (*Termination*). Wird ein Didesoxynukleotid durch die DNA-Polymerase in die Nukleotidkette eingebaut, so führt dies, durch Fehlen der 3'-OH-Gruppe, die für die Synthese der nächsten Phosphodiesterbindung benötigt wird, zum Kettenabbruch der Polymerisation.

Dabei handelt es sich um eine statistische Unterbrechung der enzymatischen Replikation (Kettenabbruchmethode). Das Verhältnis von Desoxy- zu Didesoxynukleotid ist für die mittlere Kettenlänge der Produkte entscheidend. Die gebildeten Oligonukleotide werden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel nach ihrer Länge getrennt. Die Basensequenz der DNA kann anschließend von einem Autoradiogramm abgelesen werden.

2.2.2.1 *Annealing*

1,5-2µg doppelsträngige *Template*-DNA wird durch Zugabe von 2µl 2M NaOH 10min bei Raumtemperatur denaturiert. Zu der Probe werden 7µl ddH_2O gegeben und diese durch Zufügen von 3µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) neutralisiert. Die DNA wird anschließend mit 60µl 100%igem Ethanol gefällt. Die Fällungsreaktion verläuft für 15min bei -70°C. Nach anschließender Zentrifugation (10min, 4°C, 12.000g) sowie Verwerfen des Überstandes, wird die DNA mit 70%igem Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird

nach der Zentrifugation entfernt, das Pellet kurz im Vakuum getrocknet und in 10µl ddH_2O aufgenommen.
Die Lösungen werden mit 2µl *Annealing*puffer, 2µl *Primer* (7-10ng) sowie 1µl DTT (0,1M) versetzt, 20min bei 37°C und anschließend 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese *Annealing*ansätze können sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

Annealingpuffer: 0,28M Tris/HCl, pH 7,5; 0,1M $MgCl_2$; 0,35M NaCl

2.2.2.2 *Labelling*

Die *Annealing*ansätze werden mit 2µl *Labelling*mix, 1µl [α-^{35}S]dATP und 2µl verdünnter T7 DNA-Polymerase (Firma: Pharmacia; 1,5U/µl) versetzt, gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

*Labelling*mix: 2µM dTTP, dGTP, dCTP

2.2.2.3 Termination

Je 2,5µl der vier verschiedenen Terminationsmixe werden für etwa 1min bei 37°C vorgewärmt. Sofort nach Ende der *Labelling*reaktion werden 4,5µl der *Labelling*ansätze zu den Terminationsmixen pipettiert und die Reaktion nach 5min Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 5µl Stopplösung (Sequenzierauftragspuffer, SAP) beendet.
Unmittelbar vor dem Auftrag auf das Sequenziergel werden die Ansätze für 2min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Es werden je Probentasche 2µl eingesetzt.

Terminationmixe: 15µM ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP; je 150µM dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 40mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM $MgCl_2$; 50mM NaCl

Stopplösung: 95% (v/v) deionisiertes Formamid; 20mM EDTA, pH 7,5; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,05% (w/v) Xylen Cyanol FF

2.2.2.4 Sequenziergel

Die elektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente erfolgt in einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel mit konischen *Spacern* (0,2-0,6mm Dicke).
Die mit Ethanol gereinigten Glasplatten werden mit Haftsilan (40µl Silan A-174 = τ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan, BDH) und 200µl 10%ige (v/v) Essigsäure in 10ml Ethanol) beziehungsweise *Repell*silan (5ml 10%iges Dichlordimethylsilan in Toluol) beschichtet und die Platten nach etwa 10min Trocknungszeit gründlich poliert. Für 50ml 6%ige Acrylamidlösung werden 25g Harnstoff, 10ml AA/BisAA (29+1; Firma: AGS), 2,5ml 20xTTE mit ddH_2O aufgefüllt. Die Lösung wird unter leichter Erwärmung gerührt, bis sich der Harnstoff löst. Durch Zugabe von 27µl TEMED und 270µl APS 40% (w/v) wird die Polymerisation gestartet und das Gel für eine Stunde auspolymerisiert.
Das Gel wird in eine temperierbar Elektrophoresekammer (T≈55°C) eingebaut. Beide Pufferbehälter werden mit 1 x TTE-Puffer gefüllt. Die Auftragstaschen werden von Luftblasen befreit, mit etwa 2µl SAP gefüllt. Ein Vorlauf wird für 30 bis 60min bei 1500V durchgeführt.
Anschließend werden 2µl der vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert und die DNA-Fragmente bei 1500V etwa 2-3h (bis das den Proben zugesetzte Bromphenolblau das Gelende erreicht hat) getrennt.
Zur Entfernung des Harnstoffs wird das Gel für 1-2 h in 10%ige (w/v) Essigsäure gelegt und anschließend bei 65°C getrocknet. Die radioaktiv markierten Banden werden durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Firma: Kodak; Kodak Bio Max) sichtbar gemacht.
Die Sequenz des *ecoRI*-Gens ist im Anhang angegeben. Folgende *Primer* wurden zur Sequenzierung des *ecoRI*-Gens verwendet:

Name des *Primers*	Sequenz
H239	TTCAAAGCAGAAGGC
H1	GATCTTGGCGGTA
M2	TCGAAAGATCTCATAA
H955	TGTATTAACAAATTT

TTE-Puffer: 90mM Tris; 30mM Taurin; 0,4M EDTA (pH-Wert nicht eingestellt)

2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird in dieser Arbeit die T4-DNA-Ligase der Firmen USB oder MBI-Fermentas verwendet.

Ligationspuffer: 40mM Tris/HCl pH 7,8; 10mM $MgCl_2$; 10mM DTT; 5mM ATP (Fermentas)
66mM Tris/HCl pH 7,6; 6,6mM $MgCl_2$; 10mM DTT; 66µM ATP (USB)

2.3 Proteinisolierung

2.3.1 Expressionstest

Die in TGE900(pEcoR4) erzielten Klone werden in einer 5ml-Kultur unter Ampicillinzusatz angeimpft und in der exponentiellen Wachstumsphase nach Glucosezusatz durch Temperaturerhöhung induziert. Eine auftretende Proteinüberexpression wird auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.3.5) überprüft.

2.3.2 Fermentation

Die Produktion größerer Mengen der erzielten *Eco*RI-Mutanten erfolgt nach Expression der Proteine in TGE900(pEcoR4) in einem 10l-Fermenter unter sterilen Bedingungen. Dazu wird der Fermenter mit 8l entionisiertem Wasser beschickt und für mindestens 14h bei 120°C sterilisiert.

Nach der Zugabe von 1l sterilisiertem 10 x LB-Medium, 1g Ampicillin, 0,3g Chloramphenicol sowie 3ml Entschäumer (Extran 31, Merck), wird das Medium durch Zugabe einer 500ml Vorkultur angeimpft. Es folgt eine Anzucht der Zellen, unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes (7,5) bei 28°C bis zu einer OD_{600} von 2. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte erfolgt die Zugabe von 500ml Glucoselösung (500g/l), 500ml Caseinhydrolysatlösung (200g/l) sowie die Induktion der Proteinexpression durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C. Nach zweistündiger Expression wird der Fermenterinhalt zentrifugiert (Cryofuge, 5000rpm, 10min). Nach Resuspension der Zellen in 200ml ST-Waschpuffer erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt (Cryofuge, 5000rpm, 10min) mit anschließender Resuspension in 50ml PDL 0,5M NaCl. Die gewonnen Zellen können direkt zur Aufarbeitung (siehe 2.3.3) eingesetzt oder eingefroren werden (-20°C).

ST: 10mM Tris/HCl, pH 7,6; 100mM NaCl

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

2.3.3 Zellaufschluß

Der Zellaufschluß der TGE900(pEcoR4)-Zellen erfolgt durch Ultraschall. Dazu werden die Zellen in ein Becherglas überführt und für zehnmal 30s (*Duty Cycle*: 60% *Output Control*: Stufe 6, 30s Pause) mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250, Ultrasonics) behandelt. Dabei wird die Probe unter ständiger Eiskühlung gehalten. Im Anschluß an jede Beschallungsphase ist darauf zu achten, daß der Zellaufschluß gut durchmischt wird. Um Zelltrümmer und unversehrte Zellen abzutrennen, wird im Anschluß eine Ultrazentrifugation (10000g, 4°C, 1h) durchgeführt, wobei anschließend das klare Zellysat weiterverwendet wird.

2.3.4 Affinitätschromatographie

Das unter 2.3.3 gewonnene klare Zellysat wird in einem ersten Aufreinigungsschritt einer Trennung an Ni-NTA-Agarose (Firma: Qiagen) unterzogen. Da alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *Eco*RI-Mutanten als C-terminale His_6-Fusionsproteine kloniert wurden, können sie über eine Bindung der Histidinreste als zusätzliche Liganden an Ni^{2+}-Ionen koordiniert und somit schnell und effizient gereinigt werden (siehe Abbildung 9).

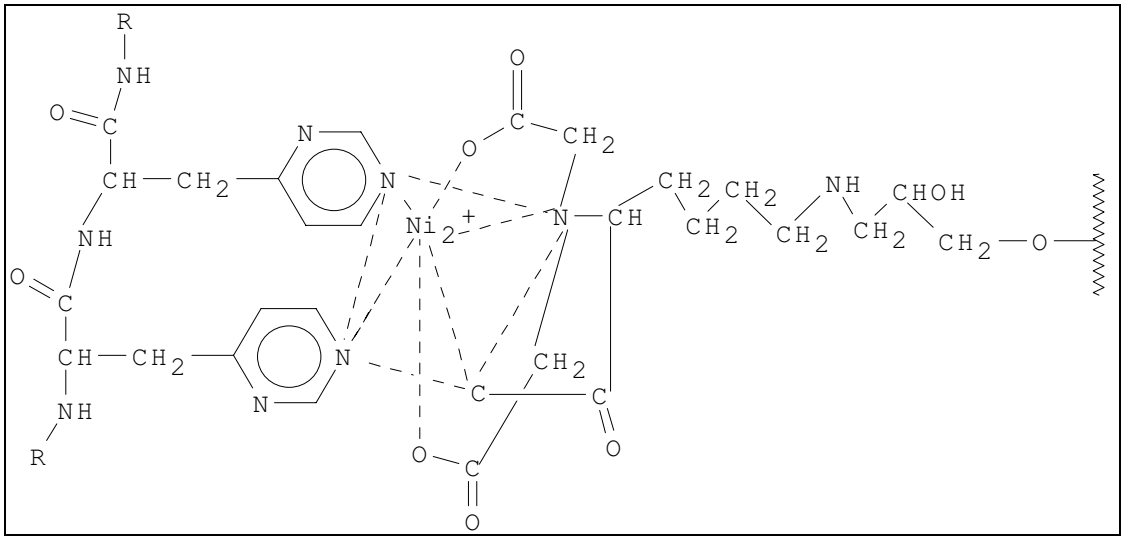

Abb. 9: Modell der Bindung benachbarter Histidinreste an Ni-NTA-Agarose (aus The QIAexpressionist)

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist, handelt es sich bei der Ni-NTA-Agarose um ein Metall-Chelat-Adsorbens. An eine Agarosematrix sind über chelatisierende Nitrilotriacetat (NTA)-Gruppen Ni-Ionen gebunden. Das Material besitzt eine hohe Affinität für Proteine mit benachbarten, frei zugänglichen Histidinresten [Hochuli, 1990]. Das Protein wird durch Koordination der Histidinreste an die Ni^{2+}-Ionen gebunden. Die Elution gebundener Proteine erfolgt durch einen Puffer, der Imidazol als konkurrierenden Liganden enthält.

Da DNA-Bindung an Proteine unter Hochsalzbedingungen nicht mehr zu beobachten ist, können durch das strikte Einhalten von hohen Ionenstärken bereits in diesem Schritt DNA-Verunreinigungen entfernt werden. Die Bindung von Proteinen an Ni-NTA-Agarose wird dagegen durch hohe Ionenstärken nicht beeinflußt [The QIAexpressionist 1997].

Eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Säulenvolumen: 1ml) wird mit 100ml PDL-Puffer/0,5M NaCl/10mM Imidazol äquilibriert. Das klare Zellysat wird zur Senkung der Viskosität mit Äquilibrierungspuffer auf 300ml verdünnt. Der pH-Wert der Verdünnung wird mit einer 100mM NH_3-Lösung auf 7,5 eingestellt. Die Auftragsgeschwindigkeit beträgt 50ml/h. Die Säule wird mit 100ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Der Elutionsprozeß erfolgt über einen linearen Imidazolgradienten von 10-150mM (in PDL-Puffer/0,5M NaCl) in einem Gesamtvolumen von 400ml. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 10ml aufgefangen, die mittels SDS-Paage (siehe 2.3.5) auf ihren Proteingehalt untersucht und sofern sie *Eco*RI enthalten, vereinigt werden.

PDL-Puffer: 30mM KP_i, pH 7,5; 0,1mM DTT; 0,01% (v/v) Lubrol

2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Das durch Affinitätschromatographie vorgereinigte Protein wird zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung in eine Ionenaustauschchromatographie mit Phosphozellulose (P-Cell, Whatman) eingesetzt. Da es sich bei *Eco*RI um ein DNA-bindendes Protein handelt, geht es wesentlich stärkere Bindungen zu den Phosphatgruppen des Austauschermaterials ein als andere Proteine. DNA wird aufgrund ihrer negativen Ladungen nicht gebunden, so daß eine quantitative Abtrennung möglich ist.

Die Phosphozellulose (Säulenvolumen: 5ml) wird mit 50ml PEDL/0,1M NaCl pH 7,2 äquilibriert. Die *Eco*RI-haltigen Fraktionen der Affinitätschromatographie werden mit PEDL-Puffer so verdünnt, daß ihre Leitfähigkeit der Leitfähigkeit des Äquilibrierungspuffers entspricht. Ist diese Verdünnung auf die Säule aufgetragen, wird zunächst mit 50ml Äquilibrie-

rungspuffer (PEDL/0,1M NaCl) gewaschen. Die Elution erfolgt mit je 5ml PEDL/0,5M; 1M; 1,5M und 2M NaCl, wobei die Eluate aufgefangen und 5x rezyklisiert werden.

PEDL-Puffer: 30mM KP_i, pH 7,5; 0,1mM DTT; 0,01% (v/v) Lubrol; 1mM EDTA (pH 8,0)

2.3.5 Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einem Polyacrylamidgel ist abhängig vom Verhältnis der Ladung eines Proteins zu seiner Größe. So können zwei Proteine verschiedener Größe in einem Polyacrylamidgel die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben, wenn ein Ausgleich durch Ladungsunterschiede erfolgt, was eine Molekulargewichtsbestimmung unmöglich macht. Da außerdem kovalent miteinander verknüpfte Untereinheiten eines Proteins nicht voneinander getrennt werden, gibt die Anzahl der im Gel beobachteten Banden nur die minimale Anzahl tatsächlich auftretender Formen an.
Um diese Probleme zu umgehen, wird eine Elektrophorese in Gegenwart denaturierender Substanzen durchgeführt. In Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergens, stellt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine dabei eine Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte dar (sehr genau gilt dies nur für vollständig denaturierte Proteine von 12-70kD) [Laemmli, 1970]. SDS bindet an hydrophobe Bereiche eines Proteins, wobei die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren. Durch die Bindung werden viele negative Ladungen an die denaturierte Polypeptidkette angelagert, welche alle normalerweise vorhandenen Ladungen überdeckt.
Sind Untereinheiten durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft, so können diese durch Erhitzen in Gegenwart von SDS und β-Mercaptoethanol (Reduktion der Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen) dissoziiert werden. Eine Blockierung mit alkylierenden Reagenzien verhindert eine Renaturierung.
In dieser Arbeit wurde zur Trennung der Proteine eine 17,5%ige Acrylamid-Konzentration gewählt. Zur Konzentrierung der Proteine wurde darauf ein 6%iges Sammelgel gegossen.

17,5%iges Trenngel:	5ml Stammlösung (17,5%) Starten der Polymerisation durch je 10µl TEMED und 40%iger APS-Lösung
6%iges Sammelgel:	2ml Stammlösung (6%)

Starten der Polymerisation durch je 4µl TEMED und 40%iger APS-Lösung

Probenvolumina bis 20µl werden direkt mit 5µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt und anschließend aufgetragen.
Sind größere Probenvolumina zu konzentrieren, so wird das in der Lösung enthaltene Protein durch Zugabe ein Zehntel Volumens 100%iger (w/v) TCA-Lösung gefällt und durch Zentrifugation (12000g, 15min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wird entfernt und das Sediment in 10µl Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Kommt es bei der Zugabe des Puffers zu einem Farbumschlag, so wird die Lösung durch Zugabe von 0,5µl 2M Tris neutralisiert.

Laufpuffer (10x): 0,25M Tris/HCl, pH 8,3; 1% SDS, 1,9M Glycin

Stammlösung (17,5%): 0,42M Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 17,4% AA 0,46% BisAA

Stammlösung (6%): 0,125M Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 6,0% AA 0,16% BisAA

Laemmli-Auftragspuffer: 10mM Tris/HCl, pH 6,8; 20mM DTT; 0,4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 2% (v/v) Glycerin

Färbung der Laemmli-Gele (Proteinnachweis):
Der Proteinnachweis erfolgt durch Anfärbung in einer Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,2%) und G 250 (0,05%) in 10%iger (v/v) Essigsäure bei etwa 90°C (Nachweisgrenze: 10ng).
Das Gel wird in etwa 100ml Färbelösung überführt und einmal aufgekocht. Die Entfärbung erfolgt in 7%iger (v/v) Essigsäure.

2.3.6 Dialyse

Um das Protein für eine dauerhafte Aufbewahrung zu stabilisieren, wird das Eluat über Nacht gegen 1,5l PDL-Puffer/0,3M NaCl/70% (v/v) Glycerin dialysiert (Dialyseschläuche: VISKING, molekulare Ausschlußgrenze 12000-14000 Da).

Die Proteinkonzentration der dialysierten Lösung wird UV-spektroskopisch ermittelt. Die Reinheit der erhaltenen Fraktion wird mittels SDS-Paage überprüft. Die Lagerung des Proteins in der Glycerinlösung erfolgt bei -20°C.

Dialysepuffer: 30mM Kp_i, pH 7,2; 0,1mM DTT; 0,01%(w/v) Lubrol; 300mM NaCl; 70% Glycerin (v/v)

2.3.7 UV-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmungen eingesetzter *Eco*RI-Proteine erfolgen durch UV-Spektroskopie im Bereich von 220 bis 320nm. Proteinspektren werden mit Hilfe eines Hitachi U-3210 Spektrophotometers aufgenommen. Die Messung erfolgt bei Raumtemperatur in Quarzküvetten (Schichtdicke: 1cm). Als Extinktionskoeffizient für das Dimer der *Eco*RI-Mutanten dient der Wert des Wildtypenzyms: ε_{278}= 52985 $M^{-1}cm^{-1}$ [Modrich & Zabel, 1976].

2.3.8 *Semi dry*-Western *Blot* (Immuno*blot*)

Der spezifische Nachweis der aufgereinigten Proteine erfolgt über einen polyklonalen Antikörper (*Rabbit Anti Eco*RI, [Fritz, 1994]). Der gebundene primäre Antikörper kann durch einen zweiten Antikörper (*Goat Anti Rabbit* IgG, Firma: Sigma) erkannt werden. Die Kopplung des zweiten Antikörpers mit Meerrettichperoxidase ermöglicht den Nachweis der Banden durch eine anschließende Farbreaktion.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels einer SDS-Paage. Eine Nitrozellulosemembran wird durch Benetzung mit Methanol aktiviert und anschließend im *Blot*puffer inkubiert. Zusätzlich werden sechs Lagen Whatman *Blot*papier (Stärke 003, Schleicher & Schüll) ebenfalls in *Blot*puffer inkubiert. Anschließend werden die Lagen in folgender Reihenfolge auf die *Blot*-apperatur (*Semi dry-Blotter* Pegasus, Phase) gelegt: 3 Lagen *Blot*papier/Nitrozellulosemembran/Gel/3 Lagen *Blot*papier. Der anodische *Blot* erfolgt 60min bei konstant 100mA (Gelfläche: 7 x 10cm).

Die Blockierung der unspezifischen Bindungsplätze erfolgt durch TBS/3% Magermilchpulver (2h, RT). Nach dreimaligem Waschen mit TBS wird die Membran mit dem ersten Antikörper (1:5000 verdünnt in TBS/1% Magermilchpulver) inkubiert (2h, RT). Im Anschluß an ein zweimaliges Waschen mit 20ml TBS/0,05% Tween und dreimaligem Waschen mit 20ml TBS erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:1000 verdünnt in TBS/1% Magermilch-

pulver (2h, RT)). Nachdem die Membran wiederum zweimal mit 20ml TBS/0,05% Tween und dreimal mit 20ml TBS gewaschen wurde, erfolgt die Färbung durch Zugabe jeweils einer Spatelspitze Co-(II)-chlorid und 3,3-Diaminobenzidin*4HCl*2H_2O in 20ml TBS. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50µl H_2O_2 gestartet. Sind die Banden eindeutig zu erkennen, wird die Färbung durch Zugabe von Wasser gestoppt. Der *Blot* wird mehrfach mit Wasser gewaschen und ist in der Dunkelheit über längere Zeit stabil.

TBS: 10mM Tris/HCl, pH 7,5; 150mM NaCl

Blotpuffer: 25mM Tris; 192mM Glycin; 1% SDS

2.4 Kinetische Charakterisierung

Innerhalb dieser Arbeit wurde das kinetische Spaltverhalten der isolierten Proteine mit Hilfe unterschiedlicher Substrate untersucht.

2.4.1 Spaltkinetiken mit λ-DNA

Die Spaltung des makromolekularen Substrats λ-DNA (48502Bp) ist als Standardtest zur Charakterisierung aufgereinigter *Eco*RI-Mutanten etabliert. Hieraus kann eine Berechnung der spezifischen Aktivität (U/mg Protein) erfolgen (1U ist definiert, als die Menge Protein (*Eco*RI), die 1µg λ-DNA unter Standardpufferbedingungen innerhalb 1h in einem Reaktionsvolumen von 60µl bei 37°C spaltet). λ-DNA besitzt fünf spezifische *Eco*RI-Spaltstellen, so daß nach einer Spaltung ein charakteristisches Bandenmuster entsteht, welches zusätzliche Aussagen über bevorzugte Spaltgeschwindigkeiten an einzelnen Spaltstellen und Spezifität sowie Güte der Präparation durch eventuell auftretende Nukleaseaktivität erlaubt.
Die Spaltung erfolgt unter verschiedenen Pufferbedingungen. Bei Anwendung relaxierender *Star*bedingungen (Mangan statt Magnesium oder pH 8,8 in Verbindung mit niedriger Ionenstärke oder Zugabe organischer Lösungsmittel, wie zum Beispiel Glycerin) werden sogenannte *Star*spaltstellen gespalten. Diese Spaltstellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie in einem Basenpaar von der spezifischen Erkennungssequenz abweichen.
Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Spaltaktivität wird die Ionenstärke auf die Ionenstärke des Standardpuffers eingestellt, während der gewünschte pH-Wert über den Tris/HCl-

Puffer eingestellt wird. Von der Mutante M137H wurde eine pH-Abhängigkeit unter Niedrigsalzbedingungen aufgenommen. Hier wurden die Salzkonzentrationen des pH-Puffers verwendet, wobei ebenfalls der entsprechende pH-Wert über den Tris/HCl-Puffer eingestellt wurde.

*Eco*RI-Standardspaltpuffer: 20mM Tris/HCl; pH 7,5; 10mM $MgCl_2$; 50mM NaCl

Mn-Spaltpuffer: 20mM Tris/HCl; pH 7,5; 1mM $MnCl_2$: 50mM NaCl

pH 8,8-Puffer: 20mM Tris/HCl; pH 7,5; 1mM $MgCl_2$; 5mM NaCl

2.4.2 Spaltkinetiken auf Plasmidebene

Das Plasmid pUC8 hat eine Größe von 2665Bp. Es eignet sich besonders gut zur quantitativen Bestimmung der Spaltaktivität von *Eco*RI-Mutanten, da es lediglich eine Spaltstelle für *Eco*RI enthält. Der Übergang des superhelikalen Plasmids durch einen Schnitt in einem Strang („*Nick*“) in die offen zirkuläre und den anschließenden zweiten Schnitt in die linearisierte Form läßt sich auf einem Agarosegel verfolgen. Die quantitative Auswertung der Banden erfolgt über das Geldokumentationssystem (E.A.S.Y.) der Firma Herolab.

2.4.2.1 Kinetische Untersuchungen mit pUC8-Derivaten Plasmiden

Hier wurden als Substrate für kinetische Untersuchungen pUC8-Derivate verwendet, die sich in jeweils drei Basenpaaren beiderseits der Erkennungssequenz voneinander unterscheiden. Hierbei handelt es sich um Plasmide, die von Frau Dr. S. Windolph in einem *Site-Selection-Assay* angereichert wurden [Windolph, 1996]. Die verwendeten Klone Nr. 2, 35, 38 sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der Klon 43 ist ein von Herrn Dr. A. Fritz selektierter Klon [Fritz, 1994]. Alle Klone wurden einer kinetischen Untersuchung unter Standardbedingungen durch die Mutante M137H und das Wildtypenzym unterzogen.

Bezeichnung des Plasmids	Plasmidsequenz
Klon 2	-TTC GAATTC CAG-
Klon 35	-TGA GAATTC TCA-

Klon 38	-AGC GAATTC GCT-
Klon 43	-TAA GAATTC TTA-

Tabelle 1: Sequenzen der pUC8-Derivate, die für Kinetiken eingesetzt wurden

2.4.2.2 Spaltung eines *Randompools* aus pUC8-Derivaten zur Bestimmung von Seitensequenzpräferenzen

Als Substrat für eine Seitensequenzanreicherung diente ein *Randompool* aus pUC8-Derivaten, der bezogen auf die drei flankierenden Basen 5' beziehungsweise 3' der Erkennungssequenz alle 4096 (4^6) möglichen Basenkombinationen enthielt (siehe 2.1.4). Es handelt sich um einen von Herrn Dr. A. Fritz hergestellten Plasmid*pool* [Fritz, 1994], der einer Anreichung durch die Mutante M137Q/N141A unterzogen wurde. Dabei ist der Plasmid*pool* unter *Star*bedingungen (pH 8,8 in Verbindung mit Niedrigsalz) von der Mutante gespalten worden, wobei die linearisierte Bande zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, an dem noch 90% der DNA in der superhelikalen oder offen zirkulären Form vorliegen. Die linearisierte DNA wurde religiert und damit der Stamm LK111(λ) transformiert. Daraus wurde eine DNA-Präparation im 100ml-Kulturmaßstab durchgeführt. In einer Sequenzierung konnten die beiden DNA-*Pools* hinsichtlich einer Anreicherung von Seitensequenzen, die sich durch eine präferentielle Spaltung ergeben, verglichen. Eine Quantifizierung erfolgte auch hier über das Geldokumentationssystem E.A.S.Y. der Firma Herolab. Dabei dienten jeweils die arithmetrisch gemittelten Intensitäten der Banden des entsprechenden Nukleotids oberhalb und unterhalb der Seitensequenzen als Bezugswerte.

2.4.3 Kinetiken mit Oligonukleotiden

Zur Untersuchung des Einflusses die Erkennungssequenz direkt flankierender Basenpaare auf die Spaltgeschwindigkeit des Enzyms, wurden kinetische Untersuchungen mit selbstkomplementären Oligonukleotiden (siehe Tabelle 2) durchgeführt, die sich lediglich in der Base direkt vor beziehungsweise nach der Erkennungssequenz unterscheiden. Diese Oligonukleotide wurden mit der Mutante M137H und dem Wildtypenzym gespalten. Diese Untersuchung wurde aufgrund des Spaltverhaltens der Mutante auf dem Substrat λ-DNA durchgeführt. Hier zeigte die Mutante ein sehr schnelles Spaltverhalten für die λ-*site* D und ein stark verlangsam-

tes Spaltverhalten für die λ-*site* B. Der Wildtyp trifft bezüglich der Spaltgeschwindigkeiten aller Spaltstellen auf dem Substrat λ-DNA keine Unterschiede.

Name	Basensequenz
λ-*Site* A	**TGA**GAATTC**GGC**
λ-*Site* B	**AAT**GAATTC**TAA**
λ-*Site* C	**AGT**GAATTC**AAA**
λ-*Site* D	**AGA**GAATTC**TGG**
λ-*Site* E	**CCT**GAATTC**ATT**
Dick AT	TAT**A**GAATTC**T**AT
Dick TA	TAT**T**GAATTC**A**AT
Dick GC	TAT**G**GAATTC**C**AT
Dick CG	TAT**A**GAATTC**T**AT

Tabelle 2: Sequenzen der für kinetische Untersuchungen durch das Wildtypenzym und die Mutante M137H eingesetzten Oligonukleotide

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, wurden weiterhin Kinetiken mit nicht selbstkomplementären Oligonukleotiden durchgeführt, deren Erkennungssequenz eine modifizierte Base enthält. Ähnliche Effekte auf die Spaltgeschwindigkeit durch Beeinträchtigung eines Basenkontaktes von der DNA wie von der Proteinseite her machen einen solchen Kontakt sehr wahrscheinlich. Folgende Mutanten wurden kinetischen Untersuchungen mit den entsprechenden Oligonukleotiden unterzogen: M137A, M137I, M137Q, G140A und A142G.

Name	Basensequenz
Strang 1 (S1)	TTACGAATTCTGCTG
Strang 2 (S2)	TCAGCAGAATTCGTA
Strang 2 *mismatch* (S2MM)	TCAGCAGAATT**T**GTA
Strang 2 5methyl-Cytosin (5metS2)	TCAGCAGAATT**5metC**GTA

Strang 2 Uracil (S2U)	TCAGCAGAATT**U**GTA
Strang 2 Uracil 2 (S2U2)	TCAGCAGAA**U**TCGTA
Strang 2 Uracil 3 (S2U3)	TCAGCAGAAT**U**CGTA

Tab. 3: Sequenzen der Oligonukleotide, die innerhalb der Erkennungssequenz im Vergleich zur kanonischen Sequenz modifiziert wurden

Zur Detektion des Ausgangssubstrates und des entstandenen Produktes findet eine radioaktive Markierung eines Oligonukleotids durch 5‘-Phosphorylierung mit ^{32}P[γdATP] mit T4 Polynukleotidkinase beziehungsweise 3‘-Phosphorylierung mit ^{32}P[αddATP] und terminaler Transferase statt (siehe 2.4.3.1). Im Anschluß an die Phosphorylierungsreaktion werden die Oligonukleotide nach dem *Nukleotide Removal* Protokoll der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Trennung von Substrat und Produkt im Anschluß an die Spaltung erfolgt durch eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden 18% igen Polyacrylamidgel (6M Harnstoff). Eine anschließende quantitative Auswertung der entsprechenden Banden findet mit dem Phosphoimager der Firma Fuji (BAS 1000 bio imager) statt.

2.4.3.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Markierungsansatz für 5‘-Phosphorylierungen:

30µl	Oligonukleotid (100µM)
4µl	10 x *Eco*RI-Standardpuffer
1µl	200mM DTT
4µl	^{32}P[γdATP] (Firma Amersham, 10µCi/µl)
1µl	T4-Polynukleotidkinase (5U/µl, Firma USB)

Markierungsansatz für 3‘-Phosphorylierungen:

15µl	Oligonukleotid (100µM)
6µl	5 x Terminale Transferase-Reaktionspuffer
1µl	^{32}P[αddATP] (10µCi/µl, Firma Amersham)
7,5µl	ddH_2O
0,5µl	Terminale Transferase (10U/µl, Firma Stratagene)

Die Inkubationsdauer beträgt jeweils 10min bei 37°C. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 3µl 1mM ATP, um in einem weiteren Inkubationsschritt eine vollständige Phosphorylierung zu gewährleisten. Um eine kinetische Unterscheidung der beiden Stränge voneinander treffen zu können, wird jeweils nur ein Strang phosphoryliert und mit dem nicht phosphorylierten Strang hybridisiert.
Die kinetischen Untersuchungen werden bei 37°C unter Standardbedingungen durchgeführt.

T4 Polynukletidkinase-Puffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,6; 10mM $MgCl_2$; 10mM β-MeSH

Terminale Transferase-Puffer: 40mM Tris/HCl, pH 7,5; 20mM $MgCl_2$; 50mM NaCl

*Eco*RI-Standardpuffer: 20mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM $MgCl_2$; 50mM NaCl

2.5 DNA-Bindungsstudien

2.5.1 Gelretardationsexperimente *(Mobility Shift Assay)*

Die Methode des *Mobility Shift Assays* beruht auf der Tatsache, daß proteingebundene DNA im nativen Polyacrylamidgel ein gegenüber der freien DNA verändertes Laufverhalten zeigt. Dieser Laufunterschied ist bereits in einem 6%igen Polyacrylamidgel bei 20cm Laufstrecke zu erkennen. Als Substrat dient ein 174 Bp langes PCR-Produkt mit einer in der Mitte gelegenen kognaten *Eco*RI-Erkennungssequenz. Als *Template* der PCR-Reaktion dient pBR322.

Name des Primers	Sequenz
Shift hin	GTGCCACCTGACGTCTAAGA
Shift her	ATACACGGTGCCTGACTGCG

Ansatz der PCR:

1 µl *Template* pBR322 (*Bam*HI-linearisiert, 20ng/µl)
1 µl *Primer Shift* hin (50µM)
1 µl *Primer Shift* her (50µM)
5 µl 10 x *Pfu* Polymerase-Puffer
5 µl 5mM dNTP-Lösung
1 µl ^{32}P[αdATP] (Firma Amersham, 10µCi/µl)
1 µl *Pfu* DNA-Polymerase (nativ, 2U/µl, Firma Stratagene)
ad 50µl Bd

PCR-Bedingungen zur Herstellung des *Shift*-Substrates:

	Temperatur [°C]	Wechselzeit [°C/s]	Reaktionszeit [s]
Denaturierung 1 x	91	3	300
Amplifikation 30 x	58	3	90
	72	3	60
	91	3	60
abschließende Extension 1 x	58	3	90
	72	3	360

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wird das PCR-Produkt zur Abtrennung freier Nukleotide und des Enzyms nach dem PCR-*quick Spin*-Protokoll der Firma Qiagen aufgereinigt.
Die zu untersuchenden *Eco*RI-Enzyme werden in einem Konzentrationsbereich von 0,1nM - 2,5µM mit 0,5nM oder 1nM PCR-Produkt für 30min bei RT inkubiert und anschließend auf ein 6%iges, natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Es wurden verschiedene in Tabelle 4 aufgeführte Lauf- und Bindungspuffer verwendet. Aufgrund einer schlechten Bindung vieler der untersuchten Mutanten, wurden ebenfalls unterschiedliche *Shift*-Bindungspuffer auf ihre Eignung hinsichtlich der Bindung von *Eco*RI an seine kognate Erkennungssequenz untersucht.

Bindungspuffer	Zusammensetzung
Shift-Puffer, pH 7,5	50mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA
Shift-Puffer, pH 7,0	50mM Bis/Tris, pH 7,0; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA
Shift-Puffer + CHAPS, pH 7,0	50mM Bis/Tris, pH 7,0; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA; 2,5 % (w/v) CHAPS

Shift-Puffer + CHAPS, pH 7,5	50mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA; 2,5 % (w/v) CHAPS
Shift-Puffer + NP, pH 7,0	50mM Bis/Tris, pH 7,0; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA; 0,1 % (v/v) NP 40
Shift-Puffer + NP, pH 7,5	50mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 10mM β-MeSH, 2mM Spermin; 0,1mg/ml BSA; 0,1 % (v/v) NP 40
„Hamburger"-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 7,9; 50mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 0,05 % (w/v) Magermilchpulver; 5 % (v/v) Glycerin
„Jen-Jacobson"-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 7,5; 120mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1mg/ml BSA; 5µM DTT
Spaltpuffer ohne Mg^{2+} pH 7,5	20mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM NaCl; 20mM EDTA
Spaltpuffer ohne Mg^{2+} pH 7,0	20mM Tris/HCl, pH 7,0; 50mM NaCl; 20mM EDTA
Triton-Puffer	20mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1mg/ml BSA; 20mM EDTA; 0,02% (v/v) Triton X-100
EDTA-Puffer, pH 7,5	20mM Tris mit EDTA auf pH 7,5 eingestellt; 50mM NaCl
EDTA-Puffer, pH 7,0	20mM Tris mit EDTA auf pH 7,0 eingestellt; 50mM NaCl

Tab. 4: Aufstellung der verwendeten *Shift*-Bindungspuffer

Zwei Bindungspuffer (*Shift*-Puffer und Spaltpuffer ohne Mg^{2+}) wurden mit unterschiedlichen pH-Werten 7,5 und 7,0 eingesetzt, da für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität bei Erniedrigung des pH-Wertes gezeigt werden konnte [Engler *et al.,* 1997]. Der oben aufgeführte „Hamburger"-Puffer wurde eingesetzt, da gezeigt werden konnte, daß die DNA-Bindungsdomäne des Protoonkogenprodukts c-Myb in diesem Puffer gute DNA-Bindungseigenschaften besitzt [Sokolowski, 1998]. Da die Zusätze NonidetP 40 oder CHAPS ebenfalls einen positiven Effekt auf die DNA-Bindungseigenschaften von Proteinen haben sollen [Hassanain *et al*., 1993], wurden Bindungsexperimente unter Zusatz dieser Chemikalien durchgeführt. Für die Mutante K117E konnte in dem aufgeführten EDTA-Puffer eine

deutlich erhöhte Bindung an ihre spezifische Erkennungssequenz festgestellt werden [Rosati, persönliche Mitteilung]. Hier wurde ein Oligonukleotid als *Shift*-Substrat verwendet, welches im Anschluß an die PCR-Reaktion ebenfalls nach dem PCR-*Purification*-Protokoll der Firma Qiagen aufgereinigt wurde, wobei jedoch alle verwendeten Puffer mit EDTA gesättigt werden, um eine Verunreinigung der erzielten Lösung mit zweiwertigen Metallionen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde ebenfalls ein Gelretardationsexperiment mit der Mutante M137A aus dem *Extended Chain*-Motiv und dem Wildtypenzym durchgeführt, um eine Übertragbarkeit dieses Phänomens auf andere Proteinvarianten zu untersuchen. Da die Bindungsexperimente unter verschiedenen pH-Bedingungen durchgeführt wurden, kamen verschiedene Laufpuffer zum Einsatz, wobei die Puffereigenschaften des Polyacrylamid-Gels denen des jeweiligen Laufpuffers entsprachen (siehe Tabelle 5).

Laufpuffer	Zusammensetzung
1 x TTE	90mM Tris; 30mM Taurin, 0,6mM EDTA (pH 9,2)
1 x TTE (pH 7,5)	90mM Tris/HCl, pH 7,5; 30mM Taurin, 0,6mM EDTA
1 x TBE	100mM Tris/Borat, pH 8,0; 4mM EDTA
1 x BTE	100mM Bis/Tris pH 7,0 (mit HCl auf pH 7,0); 2,5mM EDTA
1 x TAE	40mM Tris/Acetat, pH 8,5; 1mM EDTA

Tabelle 5: Für Gelretardationsexperimente verwendete Laufpuffer

2.5.2 Nitrozellulose-Filterbindung

Die Assoziationskonstante von DNA-bindenen Proteinen an Oligonukleotide kann mit Nitrozellulose-Filterbindungstests untersucht werden [Alves *et al*, 1989a]. Das Prinzip des Tests beruht auf einer Immobilisierung der enzymgebundenen radioaktiv markierten Oligonukleotide auf einer Nitrozellulose-Filtermembran (*Nitrocellulose Blotting Membrane* No. 11306 0,45µm Porengröße, Firma Satorius). Die Trennung gebundener Oligonukleotide von freier DNA beruht auf der Tatsache, daß lediglich gebildete Protein-DNA-Komplexe auf der Membran immobilisiert werden. Die DNA wird in Konzentrationen von 0,05 bis 1nM mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen versetzt. Die quantitative Detektion des radioaktiven Oligonukleotids erfolgt mittels des Phosphoimagers der Firma Fuji. Die Berechnung der Konstante wird mit

Hilfe eines im Tabellenkalkulationsprogramm "Excel" der Firma Microsoft erstellten Arbeitsblattes durchgeführt, dessen Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_{ass} folgende Formel ist:

$$K_{ass} = \frac{F}{(E_0 - F * O_0) * (1 - F)}$$

F = Anteil der gebundenen DNA

E_0 = Gesamtkonzentration des Enzyms

O_0 = Gesamtkonzentration des Oligonukleotids

Aufgrund der Kürze des Oligonukleotids kann von einem 1:1 Komplex ausgegangen werden. Entsprechende Enzymverdünnungen werden mit Bindungspuffer und konstanten Oligonukleotidkonzentrationen in *PCR Strip Tubes* der Firma Biozym versetzt und in einem Probenvolumen von 200µl für 30min bei RT inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wird auf eine Größe von 10 x 13cm zugeschnitten und in die *Slot-Blot*-Apparatur (Bio-Dot™ Apparatus, Firma Bio-Rad) eingebaut. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Membran mit Waschpuffer benetzt und anschließend mit dem Inkubationsansatz auf die durch eine Schablone vorgegebenen Plätze pipettiert. Durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums werden anschließend alle Proben durch die Membran gesaugt. Es folgen drei Waschschritte mit jeweils 250µl Waschpuffer. Um die unspezifische Assoziation des freien Oligonukleotids an die Membran zu quantifizieren, wird die den Ansätzen zugefügte Menge radioaktiv markierten Oligonukleotids ohne Protein als Kontrolle auf einem Membranplatz aufgegeben (Nullwert). Die Membran wird anschließend bei 60°C getrocknet.

Als Substrat werden die unter 2.4.1 aufgeführten Oligonukleotide S1/S2 und das selbstkomplementäre Dick AT sowie das unten beschriebene doppelsträngige Oligonukleotid B/C eingesetzt. Die Bindungsexperimente werden in unterschiedlichen pH-Werten (7,0; 7,5) durchgeführt, da wie unter 2.5.1 bereits beschrieben für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV bei einer pH-Werterniedrigung eine Erhöhung der Bindungsaffinität bestimmt wurde. Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide erfolgt durch 5' Phosphorylierung nach dem unter 2.4.3.1 beschriebenen Protokoll.

Waschpuffer pH 7,5: 20mM Tris/HCl, pH 7,5; 20mM EDTA; 50mM NaCl

Waschpuffer pH 7,0: 20mM Tris/HCl, pH 7,0; 20mM EDTA; 50mM NaCl

Bindungspuffer pH 7,5: 20mM Tris/HCl, pH 7,5; 20mM EDTA; 50µM DTE; 100µg/ml BSA, 50 mM NaCl

Bindungspuffer pH 7,0: 20mM Tris/HCl, pH 7,0; 20mM EDTA; 50µM DTE; 100µg/ml BSA, 50 mM NaCl

Name des Oligonukleotids	Sequenz
B	GGTTGAGTCCGGAATTCTAGATATCTTGG
C	CCAAGATATCTAGAATTCCGGACTCAACC

2.5.3 Bindungsexperimente unter Einfluß zweiwertiger Kationen

Da auch unter Bedingungen, bei denen der Wildtyp eine Bindungskonstante von 7,8 x $10^9 M^{-1}$ zeigte, keine DNA-Bindung für Mutanten mit einem Aminosäureaustausch im *Extended Chain*-Motiv festgestellt wurde, viele Mutanten jedoch eine Spaltaktivität zeigten, wurde eine Bindungsmessung unter dem Einfluß zweiwertiger Kationen durchgeführt. Da *Eco*RI in Anwesenheit vieler zweiwertiger Kationen eine Nukleaseaktivität zeigt, wurde das zweiwertige Kation Ca^{2+} verwendet. Dieses Kation erhöhte in Anwesenheit von Mg^{2+} die Aktivität der *Eco*RI-Mutante K130E, es konnte jedoch gezeigt werden, daß ohne die Zugabe weiterer zweiwertiger Kationen keine Katalyse stattfinden kann. Da die Anwesenheit von Ca^{2+} einen Einfluß auf die Wechselwirkung mit dem Nitrozellulosefilter ausübt, wurde wie unter 2.5.1 beschrieben ein Gel-*Retardations-Assay* durchgeführt.

Laufpuffer: 40mM Tris/Acetat, pH 8,3; 1mM $CaCl_2$

Bindungspuffer: 20mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM NaCl; 1mM $CaCl_2$

2.6 CD-Spektroskopie

Die Circulardichroismus-Experimente (CD) werden mit einem Jobin Yvon Dichrograph R.J. Mark III in 0,05cm Küvetten in den jeweils vorliegenden Konzentrationen in dem unter 2.3.6 aufgeführten Dialysepuffer bei Raumtemperatur bestimmt. Die Auswertung der aufgenommenen Spektren erfolgt mit dem Programm CIRC 42 (Peters & Greipel, 1993), das unter Zuhilfe-

nahme von Standardspektren den prozentualen Anteil an α-Helix und β-Faltblatt ermittelt. Das Spektrum erfaßt einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250nm.

3 Ergebnisse

3.1 Zielgerichtete Mutagenese

Das Thema der Arbeit ist die Untersuchung hydrophober Kontakte der Restriktionsendonuklease *Eco*RI zu ihrer spezifischen DNA-Erkennungssequenz. Daher wurden mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese Aminosäuren ausgetauscht, die gemäß der *Eco*RI-Cokristallstruktur solche Kontakte ausbilden [Rosenberg, 1991]. Abbildung 10 stellt diese Kontakte dar.

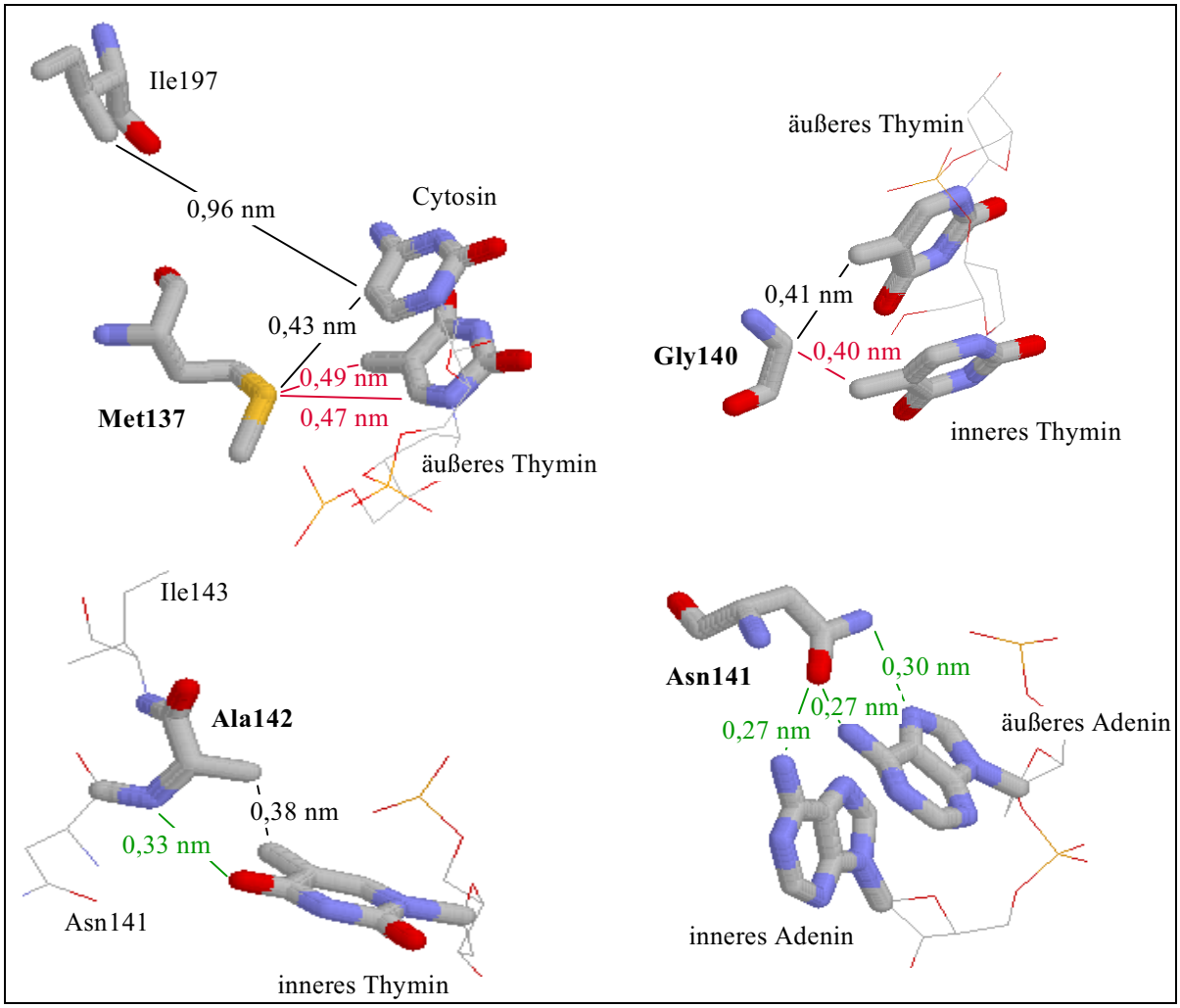

Abb. 10: Darstellung der Aminosäurepositionen, die laut *Eco*RI-Kokristallstruktur hydrophobe Kontakte mit der Erkennungssequenz eingehen [Rosenberg, 1991]. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gr ü-ne, hydrophobe Kontakte durch schwarze und mögliche weitere Kontakte, die aufgrund räumlicher Nähe zustande kommen können, sind durch rote Striche geken nzeichnet.

Die Aminosäureposition Asn141 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den Adeninen der Erkennungssequenz aus. Einzelmutanten an dieser Position wurden bereits durch Herrn Dr. A.

Fritz untersucht und charakterisiert [Fritz, 1994]. Sie wurde in diese Darstellung mit aufgenommen, da sich zwischen der untersuchten Aminosäure Glu140 und Ala142 steht, und da die Mutation N141A innerhalb der Arbeit als Teil von Mehrfachmutanten eingesetzt wurde. Der in der Abbildung 10 dargestellte hydrophobe Kontakt vom Ile197 zum Cytosin der Erkennungssequenz wird nicht ausgebildet [Küster, 1995]. Da dieser Kontakt in der *Eco*RI-Kokristallstruktur jedoch von Rosenberg postuliert wird und ein Austausch von Ile197 nach Ala in den hier hergestellten Mehrfachmutanten Anwendung findet, ist diese Aminosäure in die Abbildung 10 aufgenommen worden.

Die Einzelmutanten M137A/H/I/Q/S/R/Y, G140A/S, A142G/D/N/S und I197A, die Doppelmutanten M137Q/N141A und M137Q/A142G, sowie die Mutante H114T wurden mit Hilfe der unter 2.2.1.1 beschriebenen *Gapped Duplex*-Mutagenese hergestellt. Die Aminosäureposition H114 nimmt wahrscheinlich aufgrund ihrer Stellung in der Nähe des aktiven Zentrums durch Stabilisierung von dessen Konformation indirekt an der Substraterkennung und der Katalyse teil. Die hier hergestellte Einzelmutante H114T wurde bereits als ein Enzym mit besonders hoher spezifischer Aktivität beschrieben [Flores *et al*., 1995].

Bei der Herstellung der Mutanten M137A und M137I wurde auf *Primer* zurückgegriffen, die schon im Labor vorhanden waren. Hier trat das bereits in meiner Diplomarbeit beschriebene Phänomen auf, daß Klone sequenziert wurden, die die Sequenz des *Screening*enzyms, nicht jedoch die Mutation enthielten [Küster, 1995]. Es handelte sich ebenfalls um *Primer*, die 5' der einzuführenden Mutation lediglich neun Nukleotide besaßen. Da diese *Primer* einen hohen Gehalt an A- und T-Basen enthielten, wurde vermutet, daß während der *Fill In*-Reaktion die 5', 3' Exonuklease der T7 DNA-Polymerase das bei Raumtemperatur nicht vollständig hybridisierte 5'-*Primer*ende abgespalten und entsprechend der Basensequenz des *Templates* wieder aufgefüllt hat. Eine Wiederholung der Mutagenese mit einer *Fill In*-Reaktion bei 13°C führte zu den gewünschten Mutationen. Alle folgenden *Primer* wurden mit mindestens zwölf Nukleotiden 5' der einzubringenden Mutation synthetisiert. Hier traten keine Probleme auf.

Die Mehrfachmutanten M137Q/N141A/I197A und H114T/M137Q/N141A/I197A wurden mit der unter 2.2.1.2 beschriebenen PCR-Mutagenese hergestellt. Die Abbildung 11 zeigt die erhaltenen PCR-Produkte. Die Produkte der 2. PCR-Reaktion wurden nach der Spaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen in die entsprechend gespaltene und über ein Agarosegel aufgereinigte Rahmenpräparation ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte direkt in den Stamm TGE900(pEcoR4). Eine parallel durchgeführte Transformation in LK111(λ) erzeugte keine Klone. Dieses Phänomen geht mit dem bereits in der Diplomarbeit beschriebenen

Ergebnis konform. Hier konnten ebenfalls bei einer Transformation des in den Rahmen ligierten PCR-Produktes keine Klone in LK111(λ) erzielt werden, da die Transformationsausbeute sehr schlecht war [Küster, 1995]. Es wurden jeweils 200ng PCR-Produkt mit 200ng Rahmenpräparation ligiert. Die Transformationsausbeute lag bei einer Kompetenz der Zellen von 10^7cfu/µg DNA (*supercoiled* Plasmid) bei fünf bis acht Klonen pro Transformation. Das spricht entweder für eine sehr schlechte Ligationsausbeute von PCR-Produkten oder für eine schlechte Transformationseffizienz von klonierten PCR-Produkten. Dieses Phänomen konnte von anderen Arbeitsgruppenmitgliedern (Rosati, persönliche Mitteilung) bestätigt werden.

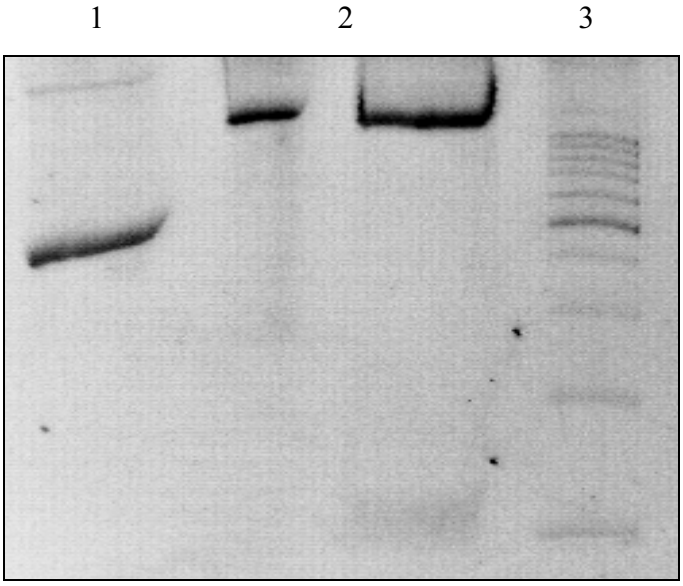

Abb. 11: Produkte der PCR-Mutagenese der Trippelmu tante M137Q/N141A/197A. Auftrag: Spur 1: 1. PCR-Produkt: 458Bp; Spuren 2, 3: 2. PCR-Produkt: 1163Bp; Spur 4: Std. 100Bp - 1000Bp

Um Sekundärmutationen auszuschließen, wurden alle erzeugten Mutanten durch Sequenzierung des gesamten *ecoRI*-Gens verifiziert.

3.2 Protein-Aufarbeitung

Der Expressionsstamm TGE900(pEcoR4) wurde mit den hergestellten Plasmiden transformiert und von jeder Mutante drei bis fünf Klone anschließend im 5ml-Maßstab hinsichtlich ihrer Expression überprüft (siehe 2.3.1). Verlief die Induktion bei allen Klonen einer Mutante negativ, so wurde ein erneuter Transformationsschritt von TGE900(pEcoR4) durchgeführt.

Da für Einzelmutanten im *Extended Chain*-Motiv ein schlechtes Bindungsverhalten gekoppelt mit einer verminderten Katalyse der Reaktion zu erwarten ist, wurde auf eine sonst übliche Aufreinigung im 100ml-Maßstab verzichtet. Alle untersuchten Proteine wurden sofort im 10l-

Maßstab fermentiert. Die Aufreinigung der Proteine über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde wie unter 2.3.4 beschrieben durchgeführt und verlief ohne Probleme, wobei die Mutanten mit einer Imidazolkonzentration von 120mM bis 180mM von der Säule eluiert wurden (siehe Abbildung 12).

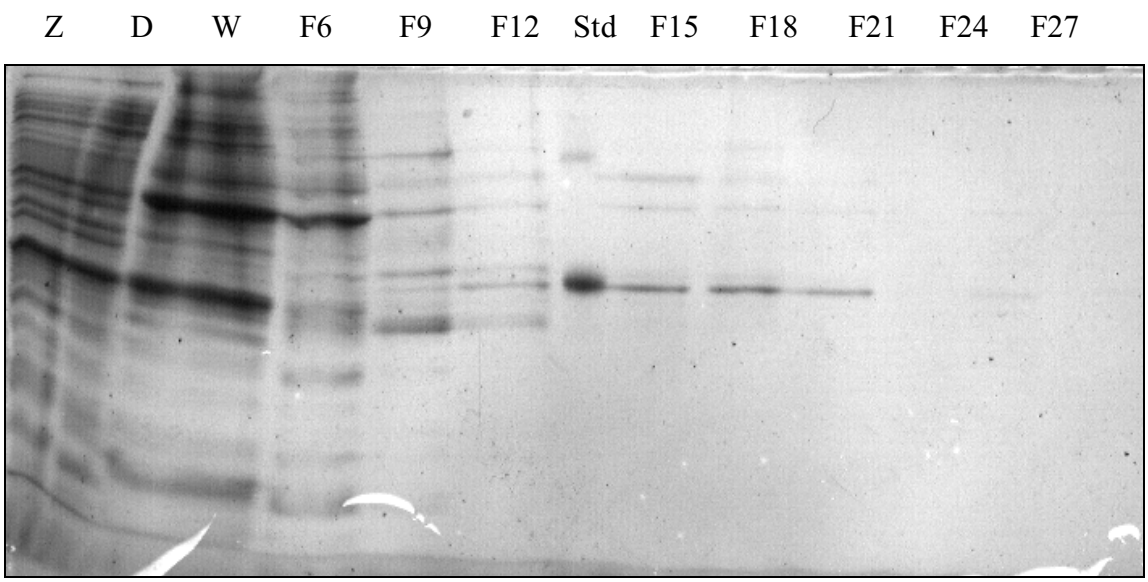

Abb. 12: Aufreinigung der *Eco*RI-Mutante M137A durch Affinitätschromatographie. Auftrag: Zellysat (Z, 2µl), Durchlauf (D, 2µl), Waschfraktion (W, 50µl), Elutionsfraktionen (ab Fraktion 6, jede 3. Fraktion, 200µl)

Die *Eco*RI-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Einstellung des pH-Wertes sowie der Leitfähigkeit auf eine Phosphozellulosesäule aufgetragen. Die Elution erfolgte nach einem Waschschritt mit 1 x PEDL/0,1M NaCl wie unter 2.3.4.2 beschrieben. Die Mutanten wurden bei einer Konzentration von 1 bis 1,5M NaCl von der Phosphozellulosesäule eluiert (siehe Abbildung 13). Proteine, die bei einer Konzentration von 2M NaCl eluiert wurden, wurden zwar dialysiert, jedoch nicht weiter charakterisiert, da hier die Gefahr bestand, daß bereits auf der Säule ausgefallenes und damit inaktiviertes Protein wieder in Lösung gebracht wurde. In diesen Fällen konnte zumindest ein Teil des Proteins bereits bei geringeren NaCl-Konzentrationen gewonnen werden, diese Fraktionen wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

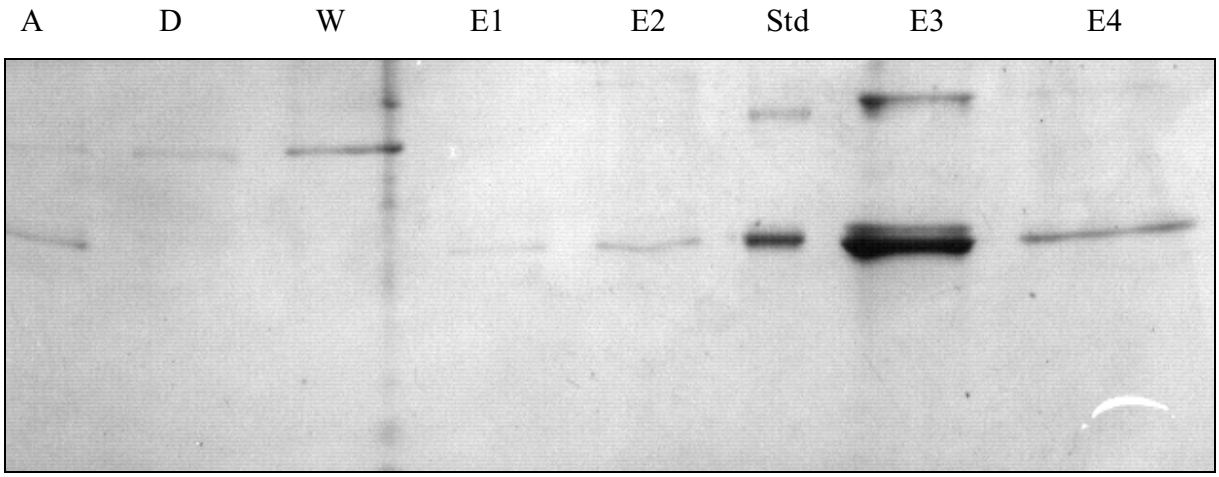

Abb. 13: Elutionsverhalten der Mutante M137A von der Phosphozellulosesäule Auftrag: A (1ml, vereinigte Elutionen der Affinitätschromatographiesäule); (1ml, Durchlauf, D); (Waschfraktion, 500µl, W); (Elutionsfraktionen mit steigender NaCl-Kon zentration, 200µl, E1 bis E4)

Die Expressionseffizienz der Mutanten war unterschiedlich, so daß Proteinpräparationen in einer Konzentration von 0,81-7,9µM erhalten wurden. Die Reinheit der Proteine lag zwischen 80 und 95% nach einer Begutachtung auf dem Laemmli-Gel (siehe Tabelle 5), wobei die Hauptverunreinigung eventuell ein Dimer des Enzyms ist (siehe auch 3.6.2). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte, wie unter 2.3.7 beschrieben, über die Aufnahme eines UV-Spektrums. Die Güte der Proteinpräparationen wurde über eine Coomassiefärbung der Proteine nach Auftrennung auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.3.5) durchgeführt.

Mutante	Konzentration [µM]	Reinheit [%]
H114T	1,4	>90
M137A	4,3	90
M137E	0,6	>90
M137H	3,8	85
M137I	2,8	90
M137Q	0,8	>90
M137R	0,5	80
M137S	0,9	85
M137Y	1,0	80

G140A	3,9	>90
G140S	1,3	80
A142D	2,7	90
A142G	3,0	>90
A142N	1,4	85
A142S	3,1	>90
I197A	3,7	90
M137Q/A142G	0,8	>90
M137R/A142G	0,6	90
M137Q/N141A	5,2	80
M137Q/N141A/I197A	7,9	>90
H114T/M137Q/N141A/I197A	0,47	85

Tab. 5: Konzentrationen und Sauberkeit der Proteinpräparationen der Mutanten nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose und Phosphozellulose

Die erhaltenen Proteinpräparationen wurden wie unter 2.3.8 beschrieben auf eine Nitrozellulose-Filtermembran ge*blottet* und mit einem polyklonalen Antikörper als *Eco*RI-Mutanten nachgewiesen [Fritz, 1994]. Die Effinzienz der Färbung mit diesem Antikörper war allerdings nicht hoch genug, um die Hauptverunreinigung eindeutig als *Eco*RI-Dimer nachweisen zu können.

3.3 CD-Spektren

Von den aufgereinigten Proteinen konnten nur CD-Spektren derjenigen Mutanten aufgenommen werden, deren Konzentration höher als 1,5µM lag (siehe Abbildung 14). Da aus technischen Gründen häufig ein längerer Zeitraum zwischen der Proteinpräparation und der Aufnahme der CD-Spektren lag, besteht unter Umständen die Möglichkeit der Aggregation. Unterschiede in den Konzentrationsbestimmungen, die im Anschluß an die Proteinpräparation mittels UV-Spektroskopie und später mittels CD-Spektroskopie bestimmt wurden, sprechen für diese Tatsache.

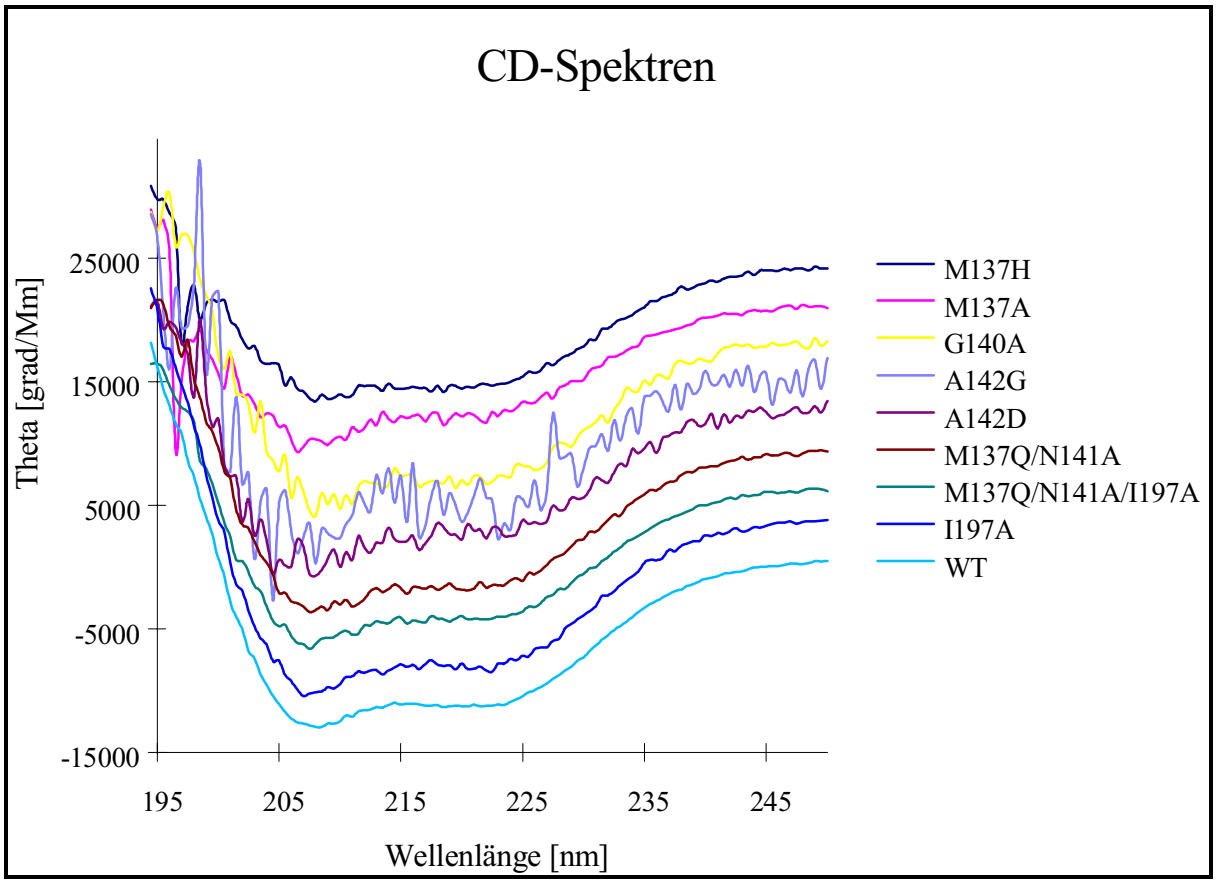

Abb. 14: CD-Spektren von Mutanten (Konz. > 1,5µM) im Vergleich zum Wildtypenzym. Zur graphischen Darstellung wurden die Proteinspektren in aufsteigender Reihenfolge mit einem Faktor von jeweils 3000grad/Mm zum vorhergehenden Spektrum multipliziert worden.

Aus den in Abbildung 14 dargestellten CD-Spektren ergeben sich für die einzelnen Proteine folgende in Tabelle 6 aufgeführte Sekundärstrukturgehalte:

Enzym	Sekundärstrukturanteile	
	α-Helixgehalt [%]	β-Faltblattanteil [%]
Wildtyp	39	16
M137H	30	17
M137A	30	16
G140A	37	18
A142G	35	16
A142D	33	18
M137Q / N141A	37	18
M137Q / N141A / I197A	36	16
I197A	39	18

Tab. 6: Berechnete Sekundärstrukturgehalte der Mutanten aus den CD-Spektren

Die Darstellung des CD-Spektrums der Mutante A142G erfolgte durch Akkumulation mehrer Spektren. Die hier untersuchten Mutanten des *Extended Chain*-Motivs wiesen im Vergleich zum Wildtypenzym einen geringen Rückgang des α-Helixgehalts auf. Der β-Faltblattanteil der Mutanten entsprach weitgehend dem Anteil, wie er auch beim Wildtypenzym bestimmt wurde.

3.4 Kinetische Charakterisierungen

Zur Untersuchung biochemischer Eigenschaften der *Eco*RI-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym hinsichtlich der katalytischen Aktivität und der Sequenzspezifität, wurden kinetische Untersuchungen mit unterschiedlichen Substraten unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt.

3.4.1 Spaltverhalten mit λ-DNA

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der erhaltenen *Eco*RI-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym wurde mit linearer λ-DNA als Substrat durchgeführt. Eine Enzymeinheit ist als die Proteinmenge definiert, die 1µg λ-DNA in einer Stunde bei 37°C unter Standardpufferbedingungen vollständig an allen fünf GAATTC-Sequenzen spaltet.

Bedingt durch die extrem hohe Spezifität der *Eco*RI für ihre Erkennungssequenz, werden unter Standardpufferbedingungen Sequenzen, die sich nur in einem Basenpaar von der Erkennungssequenz unterscheiden (*Star*sequenzen), mit bis zu 10^6fach geringerer Geschwindigkeit gespalten, wohingegen Sequenzen, die sich in mehr als einem Basenpaar von der Erkennungssequenz unterscheiden, gar nicht mehr gespalten werden [Gardner *et al.,* 1982]. Durch Veränderung der Pufferbedingungen (Anwesenheit von Mn^{2+}- statt Mg^{2+}-Ionen [Hsu & Berg, 1978; Woodhead *et al*., 1981], Zugabe organischer Lösungsmittel [Goodman *et al*., 1977, Maliguine *et al*., 1980] oder niedriger Ionenstärke in Verbindung mit alkalischem pH [Polisky *et al*., 1975]) kann die Genauigkeit der *Eco*RI reduziert werden. Diese Pufferbedingungen (siehe 2.4.1) werden *Star*bedingungen genannt, da nun auch *Star*sequenzen erkannt und gespalten werden. Sie führen gleichzeitig zu einer Erniedrigung der Spaltaktivität an den kanonischen Schnittstellen um den Faktor 10 bis 100, wie auch zu ihrer deutlichen Erhöhung an *Star*sequenzen [Woodbury *et al*., 1980]. Dies führt dazu, daß *Star*spaltung von *Eco*RI unter Standardpufferbedingungen im λ-Aktivitätstest nur bei hohen Enzymkonzentrationen zu detektieren ist und mit weitaus geringerer Geschwindigkeit erfolgt. Dagegen ist unter *Star*bedingungen das Auftreten des kanonischen Spaltmusters nur schwer nachzuweisen, da kanonische und in einem Basenpaar degenerierte DNA-Sequenzen mit annähernd gleicher Geschwindigkeit gespalten werden [Pingoud *et al*., 1985]. Das unter verschiedenen Bedingungen bestimmte Spaltverhalten der zu untersuchenden Enzyme ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Enzym	spezifische Aktivität [U/mg]	pH-Bedingungen [U/mg]	Mn^{2+}-Bedingungen [U/mg]
Wildtyp	$2{,}0 \times 10^6$	*Star*spaltung	*Star*spaltung
H114T	$> 8{,}4 \times 10^6$ (*)	*Star*spaltung	*Star*spaltung
M137A	$1{,}3 \times 10^4$	$2{,}0 \times 10^4$	$1{,}3 \times 10^2$
M137E	$2{,}1 \times 10^3$ (-λ-B) schwache spez. Banden	$2{,}1 \times 10^4$	$1{,}7 \times 10^3$
M137H	$8{,}0 \times 10^2$ (-λ-B)	$2{,}5 \times 10^4$	$7{,}2 \times 10^2$
M137I	$3{,}4 \times 10^4$	$5{,}2 \times 10^4$	$8{,}5 \times 10^2$
M137Q	$2{,}9 \times 10^6$	$1{,}8 \times 10^5$ (*)	$6{,}0 \times 10^2$
M137R	$1{,}8 \times 10^4$ (-λ-B)	$2{,}4 \times 10^4$	Andeutung spez. Banden
M137S	$5{,}5 \times 10^3$	$2{,}8 \times 10^4$	$7{,}9 \times 10^2$
M137Y	Andeutung spez. Banden	$1{,}2 \times 10^4$	keine spez. Banden
G140A	$9{,}3 \times 10^2$ schwache spez. Banden	keine spez. Banden	$2{,}7 \times 10^2$ schwache spez. Banden
G140S	Andeutung spez. Banden	keine spez. Banden	keine spez. Banden
A142G	$1{,}6 \times 10^3$	$6{,}6 \times 10^4$	$4{,}1 \times 10^2$ schwache spez. Banden
A142D	Andeutung spez. Banden	Andeutung spez. Banden	Andeutung spez. Banden
A142N	keine spez. Banden	keine spez. Banden	keine spez. Banden
A142S	$1{,}5 \times 10^4$	$1{,}1 \times 10^5$	$7{,}6 \times 10^2$ schwache spez. Banden
I197A	$7{,}6 \times 10^6$	$8{,}4 \times 10^4$ (*)	kein kan. Muster (*)
M137Q/ A142G	Andeutung spez. Banden	$5{,}8 \times 10^3$	Andeutung spez. Banden

M137R/ A142G	keine spez. Banden	keine spez. Banden	keine spez. Banden
M137Q/ N141A	keine spez. Banden	nur Spaltung der λ-D	Andeutung der λ-D
M137Q/ N141A/ I197A	keine spez. Banden	keine spez. Banden	keine spez. Banden
H114T/ M137Q/ N141A/ I197A	keine spez. Banden	Andeutung spezifischer Banden, die nicht der Größe der spezifischen *Eco*RI-Banden entsprechen	keine spez. Banden

Tab. 7: Kinetische Charakterisierung der untersuchten Mutanten und des Wildtypenzyms unter Standard- und *Star*bedingungen auf dem Substrat λ-DNA. Bedingungen unter denen das jeweilige Enzym *Star*-spaltverhalten zeigt, sind mit (*) gekennzeichnet. Ist die Angabe unter Berücksichtigung oder Ve r-nachlässigung bestimmter Spaltstellen auf dem Substrat λ-DNA gemacht worden, so ist die entspr e-chende Spaltstelle in Klammern angegeben. Die Angabe „keine spez. Banden“ bezieht sich auf eine unspezifische Nukleaseaktivität, die anstelle eines diskreten Bandenmusters einen Schmier veru r-sacht.

Die kinetische Untersuchung auf dem Substrat λ-DNA zeigte für die verschiedenen Mutanten ein erwartet breites Spektrum an spezifischen Aktivitäten unter den verschiedenen Bedingungen.

Die Mutanten H114T, M137Q und I197A zeigten ein Verhalten, das weitgehend dem des Wildtypenzyms entsprach, sie spalteten λ-DNA unter Standardbedingungen jedoch schneller. Die bereits beschriebene höhere Aktivität der Mutante H114T, die schon unter Standardbedingungen in geringer Konzentration nach kurzer Zeit in *Star*spaltung übergeht [Flores *et al*., 1995], konnte in unserem Labor bestätigt werden. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität bereitete aufgrund des kurzen Zeitbereichs zwischen dem Auftreten des kanonischen Spaltmusters und dem Übergang in das *Star*spaltmuster größte Mühe. Diese drei Mutanten waren die einzigen, die unter *Star*bedingungen auch *Star*spaltung zeigten.

Mit Ausnahme der Mutante M137Q verzeichneten alle untersuchten Mutanten des *Extended Chain*-Motivs einen deutlichen Verlust an spezifischer Aktivität. Die Mutante M137Q zeigte ein Phänomen besonders deutlich, das bei vielen anderen Mutanten der *Extended Chain* (M137A, M137H, M137I, M137S, A142G und A142S) auch auftrat. Diese Mutanten unterscheiden deutlich die *Star*bedingung pH 8,8 und Niedrigsalz von Mangan als zweiwertigem

Kation anstelle von Magnesium. Das Wildtypenzym zeigte sowohl im Auftreten des Spaltmusters, als auch in der Spaltgeschwindigkeit für beide Pufferbedingungen nur geringe Unterschiede. Unter *Star*bedingungen zeigt das Wildtypenzym gegenüber Standardbedingungen, ein um den Faktor 10 bis 100 verlangsamtes Spaltverhalten. Beide Phänomene treffen auch für die wildtypähnlichen Mutanten I197A und H114T zu. Die Mutante M137Q unterscheidet hingegen zwischen den beiden *Star*bedingungen in der Hinsicht, daß unter Manganbedingungen keine *Star*spaltung stattfindet, das kanonische Spaltmuster jedoch um den Faktor 10^4 verlangsamt gegenüber den Standardbedingungen auftritt. Lediglich unter pH-Bedingungen zeigt die Mutante ein dem Wildtyp vergleichbares Verhalten. Das kanonische Spaltmuster tritt um den Faktor 10 verlangsamt auf und geht anschließend in *Star*spaltung über. Dies ist das erste Mal, daß bei einer Mutante im *Extended Chain*-Motiv *Star*spaltung gefunden werden konnte. Die Mutante M137A differenziert ebenfalls zwischen den beiden *Star*bedingungen. Unter pH-Bedingungen findet hier im Vergleich zu Standardbedingungen jedoch keine Verlangsamung der Spaltung statt. Die spezifische Aktivität ist um den Faktor 100 gegenüber dem Wildtypenzym verlangsamt.

Die Mutanten M137E und M137H wie auch in geringerem Maße andere Mutanten im *Extended Chain*-Motiv (M137I, M137S, M137R und A142S, sowie die in Tabelle 7 nicht aufgeführte N141A [Fritz, 1994]) spalten die λ-*Site* B unter Standardbedingungen stark verlangsamt. Dieses Phänomen wurde in die Tabelle mit aufgenommen, da eine Bestimmung der spezifischen Aktivität nur ohne Berücksichtigung der Spaltung dieser Sequenz möglich war. Beide Mutanten spalten λ-DNA unter pH 8,8 und Niedrigsalzbedingungen schneller als unter Standardbedingungen. Diese Tatsache zeigt sich ebenfalls bei der Mutante M137S. Unter diesen Bedingungen wird die λ-*Site* B in einer mit den anderen Sequenzen vergleichbaren Geschwindigkeit gespalten.

Aminosäureaustausche an der Position 140 führten zu einem drastischen Einbruch der spezifischen Aktivität. Das kanonische Spaltmuster konnte lediglich für die Mutante G140A sowohl unter Standard- als auch Manganbedingungen ermittelt werden, jedoch trat in beiden Fällen eine starker Hintergrund von unspezifisch gespaltener λ-DNA auf. Das ist vermutlich auf eine leichte Verunreinigung mit einer zellulären Nuklease zurückzuführen, die bei den für diese Mutante benötigten hohen Konzentrationen und langen Reaktionszeiten erst detektiert wird. Der Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin führt zu einer Proteinvariante, die λ-DNA nicht mehr spezifisch erkennen und spalten kann. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten an Position Ala142 führen ebenfalls zu einer starken Verringerung der spezifischen Aktivität (A142G

und A142S), zu Mutanten, die das spezifische Spaltmuster vor einem starken Hintergrund unspezifischer Nukleaseaktivität andeuten (A142D) oder ausschließlich unspezifische Nukleaseaktivität zeigen (A142N). Die Mutanten A142G und A142S zeigen die oben bereits erwähnte Eigenschaft, daß unter pH-Bedingungen das kanonische Spaltmuster schneller auftritt als unter Standardbedingungen. Unter Manganbedingungen nimmt bei beiden Mutanten die Aktivität im Vergleich zu den Standardbedingungen ab. Unter Standardbedingungen zeigt sich bei der Mutante A142G zusätzlich eine unspezifische Nukleaseaktivität, die unter pH-Bedingungen in dem hier untersuchten Zeitbereich von maximal 8h nicht auftrat.

Ein vergleichbares Verhalten zeigt die Doppelmutante M137Q/A142G. Die spezifische Aktivität konnte ebenfalls nicht bestimmt werden, da die auftretenden Banden vor einem starken Hintergrund unspezifisch gespaltener λ-DNA kaum zu detektieren waren. Dies konnte unter pH-Bedingungen nicht festgestellt werden, da hier das kanonische Spaltmuster sauber auftrat.

Die Mehrfachmutanten M137R/A142G und M137Q/N141A/I197A zeigten unter den untersuchten Bedingungen lediglich unspezifische Spaltung von λ-DNA. Dies konnte auch bei der Mutante M137Q/N141A unter Standardbedingungen festgestellt werden. Es trat jedoch unter pH- sowie Manganbedingungen in dem untersuchten Zeitbereich nur eine Bande auf, deren Größe auf eine ausschließliche Spaltung der λ-*Site* D schließen läßt.

Bei der Spaltung von λ-DNA durch die Vierfachmutante H114T/M137Q/N141A/I197A deuteten sich unter pH-Bedingungen Banden an, die nicht den Größen des kanonischen Spaltmusters entsprachen. Unter Standard- sowie Manganbedingungen konnte keine spezifische Spaltung erzielt werden.

3.4.1.1 Spaltung von λ-DNA bei verschiedenen pH-Werten

Das Spaltverhalten einiger Mutanten wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (siehe 2.4.1). Die Aktivitäten der Enzyme unter den jeweiligen Bedingungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wertes [U/mg]						
Enzym	6,1	6,8	7,5	8,2	8,8	9,4
Wildtyp	$2,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
A142G	-	-	$1,6 \times 10^3$	-	$4,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$
A142S	-	-	$1,5 \times 10^4$	-	$7,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
I197A	$2,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$
M137H (N.s.)	keine Spaltung	keine Spaltung	$2,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$

Tab. 8: Aktivitäten verschiedener Mutanten in Abhängigkeit vom pH-Wert (die Aktivität der Mutante M137H wurde unter Niedrigsalzbedingungen (N.s.) bestimmt)

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit erfolgte unter Standardsalzbedingungen, wobei der pH-Wert durch den verwendeten Tris/HCl-Puffer eingestellt wurde. Die Bestimmung der Aktivitäten der Mutante M137H erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen. Hier kann nicht unmittelbar mit dem Wildtypenzym verglichen werden, da es unter diesen Bedingungen direkt ein *Star*-spaltmuster erzeugt. Wie erwartet, zeigt das Wildtypenzym bei pH 7,5 die schnellste Spaltung, die mit zu- und abnehmendem pH-Wert langsamer wird. Das Spaltverhalten der Mutanten A142G und A142S wurde lediglich im alkalischen Bereich untersucht, da diese Mutanten bei pH 8,8 und Niedrigsalzbedingungen eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum pH 7,5 und Normalsalzbedingungen zeigten. Für die Mutante A142G führt allein eine pH-Erhöhung schon zu einer leichten Erhöhung der Spaltaktivität im Gegensatz zur Mutante A142S, deren Spaltgeschwindigkeit bei pH-Erhöhung annähernd konstant bleibt. Die Spaltaktivität der Mutante I197A, die unter Standardbedingungen bereits über der des Wildtypenzyms liegt, nimmt mit ansteigendem pH-Wert nicht wie beim Wildtypenzym ab, sondern bleibt konstant bei $7,6 \times 10^6$U/mg.

Den stärksten Einfluß übt eine Änderung des pH-Wertes auf das Spaltverhalten der Mutante M137H aus. Im sauren pH-Bereich spaltet diese Mutante gar nicht, wohingegen ihre Aktivität im alkalischen pH-Bereich um den Faktor sechs gegenüber pH 7,5 ansteigt.

3.4.2 Spaltkinetiken mit pUC8-Derivaten

3.4.2.1 Kinetische Untersuchungen an pUC8-Derivaten mit unterschiedlichen Seitensequenzen

Die pUC8-Derivate 2, 35, 38 und 43 wurden wie unter 2.4.2.1 beschrieben für eine kinetische Charakterisierung der Mutante M137H und des Wildtypenzyms herangezogen. Sie unterscheiden sich in der Sequenzumgebung der Spaltstelle und waren mit der Mutante N141A als schnell beziehungsweise langsam gespaltene Sequenzen selektiert worden.

In Tabelle 9 sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang von der *supercoiled* in die offen zirkuläre Form (k_{12}), beziehungsweise für den Übergang von der offen zirkulären in die linearisierte Form (k_{23}) aufgeführt.

pUC8-Derivat	M137H		Wildtyp	
	k_{12} [Umsatz/min]	k_{23} [Umsatz/min]	k_{12} [Umsatz/min]	k_{23} [Umsatz/min]
2	$4{,}4 \times 10^{-5}$	$1{,}2 \times 10^{-4}$	$7{,}6 \times 10^{-3}$	$2{,}2 \times 10^{-2}$
35	$1{,}7 \times 10^{-5}$	$9{,}4 \times 10^{-5}$	$4{,}6 \times 10^{-3}$	$1{,}7 \times 10^{-2}$
38	$1{,}8 \times 10^{-5}$	$1{,}3 \times 10^{-4}$	$8{,}3 \times 10^{-3}$	$2{,}3 \times 10^{-2}$
43	$2{,}3 \times 10^{-5}$	$1{,}6 \times 10^{-4}$	$3{,}0 \times 10^{-3}$	$6{,}0 \times 10^{-3}$

Tab. 9: Apparente Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltung von pUC8-Derivaten, die sich hinsichtlich ihrer Seitensequenzen unterscheiden

Die relativen Spaltgeschwindigkeiten der beiden Enzyme verhalten sich auf Plasmidebene ähnlich wie auf dem makromolekularen Substrat λ-DNA. M137H spaltet alle Plasmide um den Faktor 100 langsamer als das Wildtypenzym. Beide Proteine führen den zweiten Schritt der Spaltung schneller durch als den ersten. Die erwartete Diskriminierung der Plasmide hinsichtlich ihrer Umsatzraten in Abhängigkeit von den Seitensequenzen durch die Mutante M137H gegenüber dem Wildtypenzym kann jedoch nicht bestätigt werden.

3.4.2.2 Spaltverhalten der Mutante M137Q/N141A auf einem pUC8-*Randompool*

Der von Herrn Dr. A. Fritz [Fritz, 1994] hergestellte *Randompool* bezüglich der Seitensequenzen zur *Eco*RI-Erkennungssequenz wurde für die Charakterisierung der Mutante M137Q/N141A eingesetzt (siehe 2.4.2.2). Die linearisierte Bande wurde bei einem Mengenverhältnis von 1:9 der linearisierten Bande zu der *supercoiled*- und offen zirkulären-Form auf einem 1,5%igen Agarosegel getrennt, eluiert, religiert und in Zellen transformiert. Es wurden etwa 6000 Klone erhalten, die DNA isoliert und der *Pool* der Anreicherung anschließend sequenziert. Eine Vergleich des Sequenziergels hinsichtlich der Bandenintensitäten des Ausgangs*pools* und der Anreicherung erlaubt die Aussage, daß die Mutante M137Q/N141A bezüglich der die kanonische Sequenz flankierenden Basen keine Unterscheidung, die in unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten resultieren würde, trifft. Alle vier Basen waren in gleichen Mengen an den sechs untersuchten Positionen vertreten.

3.4.3 Kinetische Untersuchungen auf Oligonukleotidebene

3.4.3.1 Verwendung selbstkomplementärer Oligonukleotide zur Charakterisierung der Mutante M137H

Da die Mutante M137H auf dem Substrat λ-DNA die λ-*Site* B mit einer stark verlangsamten, die λ-*Site* D jedoch mit einer äußerst schnellen Umsatzrate spaltete, wurde dieser Effekt auf Oligonukleotidebene überprüft und mit den kinetischen Konstanten k_{kat}/K_M quantifiziert. Die vier hier eingesetzten selbstkomplementären Oligonukleotide mit der Sequenz TATNGAATTCN'AT (N und N' beziehen sich auf die beiden Basen im Namen des entsprechenden Oligonukleotids zum Beispiel Dick AT: N=A, N'=T) unterscheiden sich voneinander lediglich in einer Base 5' beziehungsweise 3' zur Erkennungssequenz (siehe 2.4.3). Die dort aufgeführten Oligonukleotide wurden Spaltungen durch die Mutante M137H und das Wildtypenzym unterzogen. Die Kinetiken fanden unter Michealis-Menten-Bedingungen (mindestens 10facher Substratüberschuß) statt. Die Abbildung 15 zeigt einen typischen Verlauf der Reaktion anhand der Spaltung des Oligonukleotids Dick AT durch das Wildtypenzym.

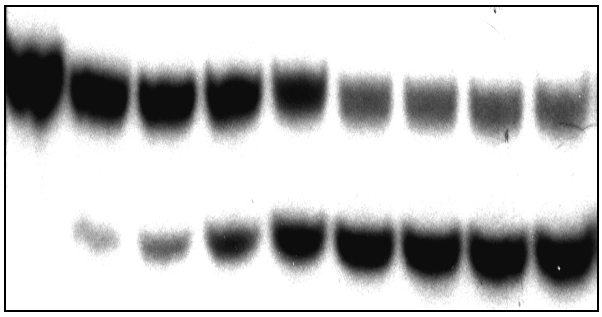

Abb. 15: Spaltverhalten des Wildtypenzyms auf dem Substrat Dick AT. Zeitwerte (von links nach rechts): 15s, 30s, 1min, 2min, 3min, 5min, 10min, 15min, 30min

In Tabelle 10 sind die durch Untersuchung des Spaltverhaltens der Mutante M137H und des Wildtypenzyms auf den selbstkomplementären Oligonukleotiden ermittelten kinetischen Parameter zusammengefaßt.

Enzym	Oligonukleotid	K_M [µM]	k_{kat} [min^{-1}]	k_{kat}/K_M [$min^{-1}M^{-1}$]
M137H	Dick AT	1,9	$5,3 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{3}$
	Dick TA	23	$7,4 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{3}$
	Dick CG	1,1	$9,2 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^{3}$
	Dick GC	44	$6,9 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{3}$
Wildtyp	Dick AT	1,0	$9,3 \times 10^{-1}$	$9,3 \times 10^{5}$
	Dick TA	0,6	$2,1 \times 10^{0}$	$3,5 \times 10^{6}$
	Dick CG	16	$8,1 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{4}$
	Dick GC	0,84	$4,5 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{4}$

Tab. 10: Kinetische Parameter der Oligonukleotidspaltung durch die Mutante M137H und das Wildtypenzym

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist, haben sich die Erwartungen bezüglich der Diskriminierung der Mutante M137H hinsichtlich der hier eingesetzten Substrate nicht in den ermittelten kinetischen Daten bestätigt. Die Mutante zeigt für alle Substrate, wie auch schon auf dem Substrat λ-DNA, eine geringere Affinität als das Wildtypenzym. Das Wildtypenzym spaltet nahezu alle Oligonukleotide mit einer Geschwindigkeitskonstante (k_{kat}), die um den Faktor 50 höher liegt als die der Mutante. Nur für das Substrat Dick GC besitzen sowohl die Mutante, als auch der Wildtyp Geschwindigkeitskonstanten, die in demselben Größenordnungsbereich lie-

gen. Das Maß für die katalytische Effektivität eines Enzyms für ein Substrat liegt aber in der Bestimmung des Verhältnisses von k_{kat}/K_M. Hier zeigen sich für die Mutante M137H keine signifikaten Unterschiede bei der Spaltung der vier Substrate. Die bestimmten Umsatzraten liegen im Größenordnungsbereich von $10^3 min^{-1}M^{-1}$. Die Mutante zeigt also nicht die gewünschte Diskriminierung der Substrate unterschiedlicher Flankensequenzen.

Eine von der Mutante erhoffte Diskriminierung läßt sich jedoch für das Wildtypenzym beschreiben. Die Substrate Dick CG und Dick GC werden mit einer um den Faktor 100 geringeren Umsatzrate gespalten als Dick TA. Als Grund läßt sich hier ein Unterschied in der Dissoziationsgeschwindigkeit, die für den Wildtyp den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt, vermuten und nicht eine erhoffte Seitensequenzbevorzugung in Erkennung beziehungsweise Katalyse [Windolph *et al.,* 1997].

3.4.3.2 Untersuchung des Spaltverhaltens auf modifizierten Oligonukleotiden

Zur vollständigen Charakterisierung der zu untersuchenden Kontakte der Restriktionsendonuklease *Eco*RI zu ihrer Erkennungsssequenz wurden kinetische Untersuchungen mit modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt (siehe 2.4.3). Die Wahl nur in einem Strang modifizierter Oligonukleotide hatte den Hintergrund, die eingeführte Störung so minimal wie möglich zu halten. Dies ist für allem für sehr stark in ihrer katalytischen Effektivität beeinflußte Mutanten wichtig. Die Folge ist ein asymmetrisches Substrat, das die separate Bestimmung der Geschwindigkeit der Spaltung beider Einzelstränge erfordert.

Die Einzelstränge der Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert (siehe 2.4.3.1) und mit dem nicht markierten komplementären Strang hybridisiert. In Tabelle 11 ist der jeweils radioaktiv markierte Oligonukleotidstrang mit * gekennzeichnet. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{app} fand unter mindestens 10fachem Substratüberschuß statt. Die Trennung der Produkte von ungespaltenem Substrat erfolgte auf einem denaturierenden 18%igen Polyacrylamidgel (siehe 2.4.3). Eine quantitative Auswertung der Substrat/Produkt-Verhältnisse erfolgte mit einem Phospho*imager* der Firma Fuji (BAS 1000 bio imaging). Die Abbildung 16 zeigt exemplarisch den kinetischen Verlauf der Spaltung eines Oligonukleotids durch das Wildtypenzym.

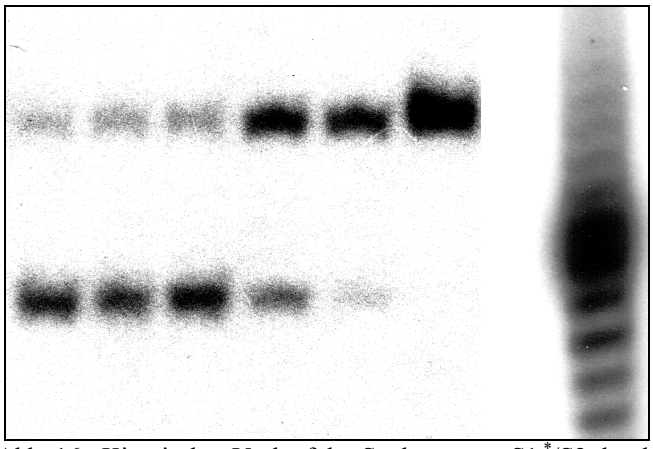

Abb. 16: Kinetischer Verlauf der Spaltung von S1 */S2 durch das Wildtypenzym. Von rechts nach links: Basenpaarleiter (Gibco-BRL); Zeitwerte: 0min, 15s, 30s, 1min, 2min, 10min

In Tabelle 11 sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der modifizierten Oligonukleotide mit den entsprechenden *Eco*RI-Mutanten aufgeführt. Die kinetischen Untersuchungen auf Oligonukleotidebene wurden mit den Einzelmutanten M137Q, M137A, M137I, G140A und A142G durchgeführt. Parallel dazu wurden alle Oligonukleotide mit dem Wildtypenzym kinetisch untersucht. Die hier angegebenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten stützen sich auf unabhängige Mehrfachuntersuchungen. Angegeben sind die Spaltgeschwindigkeiten in konzentrationsbereinigten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} in min^{-1}.

Substrat	Wildtyp	M137A	M137I	M137Q	G140A	A142G
(S1) -GAATTC- **(S2) -CTTAAG-**	471	17,7	3,2	2544	6,2	28,2
(S1) -GAATTC- (S2)-CTTAAG-	852	13,0	3,7	197	4,7	7,3
-GAATTC- **-C^{5met}TTAAG-**	367	18,0	3,2	1451	-	-
-GAATTC- -C^{5met}TTAAG-	229	3,7	1,0	371	-	-
-GAATTC- **-UTTAAG-**	177	3,9	3,6	585	-	-
-GAATTC- -UTTAAG-	357	4,7	3,8	4613	-	-

-GAATTC- **-TTTAAG-**	375	0,3	2,7	4705	-	-
-GAATTC- -TTTAAG-	231	3,4	2,6	4382	-	-
-GAATTC- **-CTUAAG-**	348	-	-	-	64,7	3,9
-GAATTC- -CTUAAG-	448	-	-	-	47,8	4,8
-GAATTC- **-CUTAAG-**	571	21,5	3,4	1227	53,3	-
-GAATTC- -CUTAAG-	431	3,8	2,0	1650	44,1	-

Tab. 11: Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten verschiedener Einzelmutanten für den modifizierten und unmodifizierten Einzelstrang. Der radioaktiv markierte Einzelstrang, dessen G eschwindigkeitskonstante bestimmt wurde, ist in der Kombination **fett** gedruckt.

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltung beider Einzelstränge im Grundoligonukleotid ohne Modifikationen durch das Wildtypenzym und die Mutanten bestätigt die für das Substrat λ-DNA bestimmten spezifischen Aktivitäten tendenziell. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist, besitzen die Mutanten M137A und M137I eine spezifische Aktivität, die um den Faktor 100 geringer ist als die des Wildtypenzyms. Die Mutanten G140A und A142G zeigen spezifische Aktivitäten, die um den Faktor 1000 beziehungsweise 10000 unter der des Wildtypenzyms liegen, wohingegen die Mutante M137Q λ-DNA schneller spaltet als der Wildtyp. Entsprechend spalten die Mutanten M137A, M137I, G140A und A142G die unmodifizierten Einzelstränge langsamer als das Wildtypenzym, wohingegen die Mutante M137Q diese Stränge schneller spaltet. Wie bereits für das Wildtypenzym gezeigt wurde, spalten auch die hier untersuchten Mutanten beide Stränge mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten [Rubin & Modrich, 1978; Halford *et al.,* 1979]. Eine Aussage aufgrund des Spaltverhaltens eines einzelnen der beiden Stränge hinsichtlich der Modifaktion läßt sich aufgrund der Tatsache nur schwer treffen, daß die Modifikation eines Stranges Auswirkung auf die Erkennung und das katalytische Zentrum beider Untereinheiten hat. Die Interpretation der Ergebnisse erfordet aus diesem Grund die Einbeziehung der Spaltergebnisse sowohl des modifizierten, wie auch des unmodifizierten Stranges.

Die Modifikationen an den einzelnen Positionen der Erkennungssequenz zeigen deutlich unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten. Eine Substitution des Cytosins durch 5-Methyl-

Cytosin zeigt den deutlichsten Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeit durch das Wildtypenzym. Hier ist die Stärke des Einflusses erwartungsgemäß davon abhängig, ob der untersuchte Strang des Oligonukleotids modifiziert ist oder nicht. Das Wildtypenzym spaltet den nicht modifizierten Strang S1 in Kombination mit 5-Methyl-Cytosin (C^{5met}) um den Faktor 4 langsamer als die unmodifierte Kombination, wohingegen der modifizierte Strang in derselben Kombination etwa gleich schnell, wie der unmodifizierte Strang gespalten wird. Ähnliche Tendenzen zeigen sich für die Uracil- und Thymin-substituierten Substrate. Hier wird jeweils der unmodifizierte Stamm schneller gespalten als der modifizierte. Beide Stränge werden jedoch in diesen Substraten insgesamt langsamer gespalten als im Grundoligonukleotid. Eine Substitution der beiden Thymine in der Erkennungssequenz durch Uracil scheint einen weitaus geringeren Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeit des Wildtypenzyms zu haben. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für beide T- nach U-substituierten Substrate unterscheiden sich nur geringfügig von denen des Grundoligonukleotids.

Die Mutanten M137A und M137I zeigen einen weitaus geringeren Einfluß bezüglich der Modifikationen auf die Spaltgeschwindigkeit beider Stränge. Das Grundoligonukleotid wird mit nahezu derselben Geschwindigkeit gespalten wie alle Substrate, die an der Cytosin-Position modifiziert sind. Ein Unterschied in der Spaltgeschwindigkeit der einzelnen Stränge in einem modifizierten Doppelstrang ist im Gegensatz zum Wildtypenzym nicht zu erkennen.

Die Mutante M137Q weicht in ihrem Verhalten deutlich ab. Eine Substitution von Cytosin durch 5-Methyl-Cytosin zeigt keinen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante, wohingegen der Austausch von Cytosin gegen Thymin zu ihrer Erhöhung führt. Eine Substitution von Cytosin zu Uracil bewirkt jedoch nur eine geringe Abnahme der Spaltgeschwindigkeit bei der Betrachtung des modifizierten Stranges.

Die Mutanten G140A und A142G zeigen auf den unmodifizierten Doppelsträngen eine gegenüber dem Wildtypenzym stark verminderte Spaltgeschwindigkeit. Eine Substitution des inneren Thymins durch Uracil bewirkt bei der Mutante A142G kaum eine Änderung der Spaltgeschwindigkeit. Die Mutante G140A spaltet jedoch beide Einzelstränge in dem an der Position des inneren, wie auch des äußeren Thymins durch Uracil modifizierten Substrats mit einer gegenüber den Grundoligonukleotid erhöhten Geschwindigkeitskonstante.

3.5 Bindungsverhalten der untersuchten *Eco*RI-Mutanten

3.5.1 Gel-Retardations-*Assays*

Mit einem PCR-Produkt von 174Bp Länge wurde in einem Gel-Retardations-*Assay* das Bindungsverhalten aller in dieser Arbeit hergestellten *Eco*RI-Mutanten untersucht (siehe 2.5.1). Lediglich für die Mutanten H114T, I197A und das Wildtypenzym konnten mit diesem Verfahren Bindungskonstanten ermittelt werden, andere Mutanten konnten jedoch durch Zusatz zweiwertiger Kationen zu einer spezifischen DNA-Bindung aktiviert werden (siehe 3.5.3).
Diese Bindungskonstanten wurden in *Shift*-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TTE verwendet. Hierbei handelt es sich um die üblicherweise in unserem Labor angewandten Bedingungen [Grabowski *et al.,* 1995].

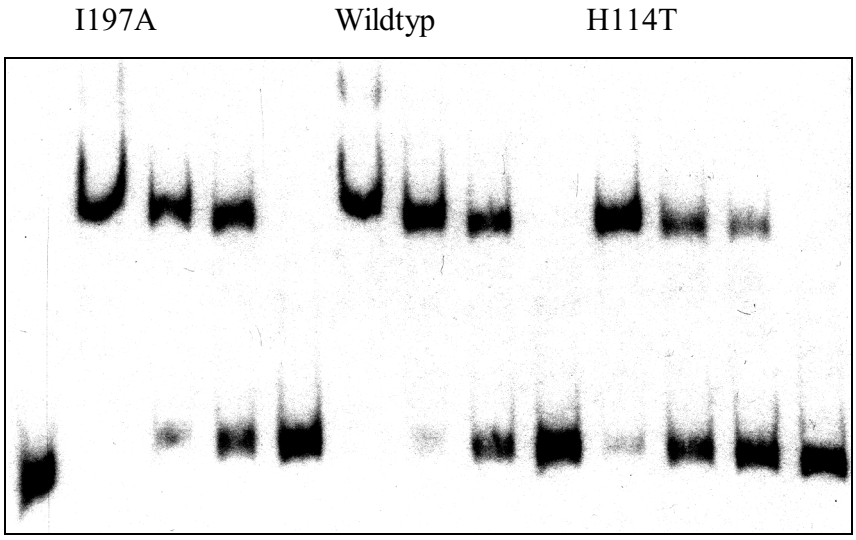

Abb. 17: *Shift*-Experimente der Mutanten I197A, des Wildtypenzyms und H114T bei einer Substratkonzentration von 1nM. Alle Enzyme wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt (von links nach rechts): 8nM; 3nM; 1nM; 0,5nM und 0,1nM. In der ersten Bande ist das freie Oligonukleotid zu sehen

Eine Auswertung der erhaltenen Anteile an freiem beziehungsweise gebundenem Substrat ergibt unter Anwendung der unter 2.5.2 aufgeführten Formel die in Tabelle 12 aufgeführten Bindungskonstanten.

Enzym	Bindungskonstante [M^{-1}]
Wildtyp	2,04 x 10^8
H114T	9,27 x 10^7
I197A	1,32 x 10^8

Tab. 12: Ermittelte Bindungskonstanten durch Gel-Retardation

Da alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Mutanten unter diesen Bedingungen auch in der maximal einsetzbaren Konzentration keine diskrete *Shift*bande im Polyacrylamidgel erzeugten, wurden die Versuchsbedingungen variiert (siehe Puffer unter 2.5.1).

Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens der Restriktionsendonuklease *Eco*RV konnte gezeigt werden, daß sich die Bindungseigenschaften bei Erniedrigung des pH-Wertes verbessern lassen [Engler *et al*., 1997]. Zur Überprüfung, ob dieses Ergebnis auch auf *Eco*RI übertragbar ist, wurde der unter 2.5.1 aufgeführte *Shift*-Puffer pH 7,0 in Verbindung mit 1 x BTE als Gelpuffer verwendet. Diese Änderung der Versuchsbedingungen zeigte jedoch nicht den gewünschten Effekt der Erhöhung der DNA-Bindungskonstanten des Wildtypenzyms.

Auch ein Wechsel des Laufpuffers von 1 x TTE (pH 9,2) zu 1 x TTE (pH 7,5), 0,5 x TTE (pH 9,2), 0,5 x TTE (pH 7,5), 1 x BTE, 0,5 x BTE, 1 x TAE und 0,5 x TAE zeigte keine Beeinflussung der *Eco*RI-Bindungskonstante.

Die Zusätze NonidetP 40 oder CHAPS im *Shift*-Bindungspuffer zeigten in anderen Arbeitsgruppen einen positiven Einfluß auf das DNA-Bindungsverhalten von Proteinen [Ebneth, persönliche Mitteilung; Abarzua *et al*., 1995; Hassanain *et al*., 1993]. Die Verwendung dieser Substanzen führte jedoch auch bei gleichzeitiger Erniedrigung des pH-Wertes auf 7,0 zu keiner Verbesserung der Bindungskonstanten des Wildtypenzyms. Als Laufpuffer dienten für die Bindungspuffer mit dem 1 x TTE; pH 7,5 beziehungsweise 1 x BTE; pH 7,0.

Der eingesetzte „Hamburger"-*Shift*-Puffer, unter dessen Verwendung die DNA-Bindungsdomäne des Protoonkogenproduktes c-Myb gute Bindungsdaten liefert [Sokolowski, persönliche Mitteilung], konnte ebenfalls nicht die Bindungseigenschaften des Wildtypenzyms verbessern.

In Nitrozellulose-Filterbindungsexperimenten wurde in anderen Arbeitsgruppen gezeigt, daß *Eco*RI unter den Bedingungen, die hier im Jen-Jacobson-Puffer eingestellt wurden, Bindungskonstanten im Bereich von $K_A = 10^9$ bis $10^{11} M^{-1}$ erzielt werden können [Jen-Jacobson *et al*., 1986; Lesser *et al*., 1992; Kurpiewski *et al*., 1996]. Diese Bindungskonstanten konnten weder

mit dem His_6-Fusionsprotein, noch mit dem His_6-freien *Eco*RI-Protein im Gel-Retardations-Experiment bestimmt werden. Auch unter diesen Bedingungen konnten lediglich Bindungskonstanten im Bereich von 2 x $10^8 M^{-1}$ für *Eco*RI bestimmt werden, wobei keine der Mutanten im *Extended Chain*-Motiv eine DNA-Bindung zeigte.

Da es sich bei den hier zu untersuchenden Mutanten um His_6-Fusionsproteine handelt, die in Ultrazentrifugationsexperimenten eine erhöhte Aggregationsneigung zeigen [Urbanke, persönliche Mitteilung], wurde Triton-Puffer eingesetzt. Das zugesetzte Triton X-100, verringert die Aggregationsneigung von Proteinen und eine eventuell auftretende Adhäsion an die Wand des Reaktionsgefäßes. Eine Erhöhung der Bindungskonstante von *Eco*RI konnte jedoch auch hierdurch nicht erreicht werden.

Die Bindungseigenschaften des Wildtypenzyms wurden ferner in Spaltpuffern mit 20mM EDTA anstelle von Mg^{2+}-Ionen, sowie mit EDTA eingestellten Puffern (höchstmögliche EDTA-Konzentration in 20mM Tris bei pH 7,5 und 7,0) bestimmt. Auch diese Änderungen der Bindungspufferzusammensetzungen zeigten keinen Einfluß auf die im Gel-Retardations-Experiment bestimmte Bindungskonstante.

3.6.2 Nitrozellulose-Filterbindung

Da die Bindungsaffinität der Restriktionsendonuklease *Eco*RI auch von den Seitensequenzen der Erkennungssequenz abhängig ist [Jen-Jacobson, 1997], wurde das Bindungsverhalten im Nitrozellulose-Filterbindungsexperiment für Oligonukleotide mit unterschiedlichen Seitensequenzen untersucht. Dazu wurden die unter 2.4.3 und 2.5.2 beschriebenen Oligonukleotide Dick AT, S1/S2 und B/C als Substrat verwendet. Wie bereits erwähnt, zeigt das *Eco*RI-His_6-Fusionsprotein eine erhöhte Aggregationsneigung. Zur Minimierung dieser Aggregationsneigung wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen die Volumina, die Stoffmengen von Enzym und Substrat sowie die Konzentrationen beider Reaktanden verändert wurden. Die Auswertung der erhaltenen Bindungskurven erfolgte über ein Arbeitsblatt mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Excel“. Die Grundlage des Arbeitsblattes bildet die unter 2.5.2 aufgeführte Formel zur Berechnung von Bindungskonstanten. Alle Experimente wurden mit den unter 2.5.2 angegebenen Puffern durchgeführt. Die eingesetzte Stoffmenge (0,1pmol) der Oligonukleotide sowie des Enzyms blieben in den Experimenten zur Ermittlung des optimalen Volumens konstant, so daß mit steigenden Volumina die Konzentrationen der Reaktanden abnahmen. Die Ermittlung der optimalen Versuchsparameter ergab die in Tabelle 13 aufgeführten Ergebnisse.

Substrat	Reaktionsvolumen [ml]				
	0,01	0,02	0,1	0,2	0,75
Dick AT	-	-	$9,3 \times 10^7$	-	-
B/C	$1,9 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$	-	-
S1/S2	$1,65 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$

Tab. 13: Erzielte Bindungskonstanten [M^{-1}] für das Wildtypenzym bei verschiedenen Reaktionsvolumina und einem pH-Wert von 7,5

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Bindungsmessungen in dem optimalen Reaktionsvolumen von 0,2ml mit dem Oligonukleotiddoppelstrang S1/S2 durchgeführt. Auch hier zeigte jedoch keine der eingesetzten Mutanten mit einem Aminosäureaustausch im *Extended Chain*-Motiv unter den beschriebenen Bedingungen eine Bindungsaffinität gegenüber dem verwendetem Oligonukleotid.

Da für die Restriktionsendonuklease *Eco*RV eine höhere DNA-Bindungsaffinität bei einer pH-Wert-Erniedrigung von 7,5 auf 7,0 beobachtet wurde [Engler *et al.*, 1997], wurden Nitrozellulose-Filterbindungsexperimente bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Die Bindungskonstante wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7,0 zu $7,8 \times 10^9 M^{-1}$ bestimmt. Auch bei einem pH-Wert von 7,0 konnte für keine der Mutanten mit einem Aminosäureaustausch im *Extended Chain*-Motiv eine DNA-Bindung festgestellt werden.

Ein Vergleich der Tabellen 12 und 13 ermöglicht eine Aussage über die zur Bestimmung der Bindungskonstanten herangezogenen Verfahren der Nitrozellulose-Filterbindung und des Gel-Retardations-*Assays*. Aus den Tabellen geht hervor, daß Nitrozellulose-Filterbindung eine deutlich empfindlichere Messung der Bindungskonstante erlaubt. Aufgrund der oben bereits erwähnten Aggregationsneigung der *Eco*RI-His_6-Fusionsproteine wirkt eine Volumenbeschränkung, wie sie bei den Gel-Retardationsexperimenten vorliegt (maximales Reaktionsvolumen: 40µl), wahrscheinlich zugunsten der Aggregation der Proteine aus, wodurch die effektive Konzentration der Proteine herabgesetzt wird. Dieses Phänomen macht sich besonders bei schlecht bindenden Proteinen bemerkbar, da hier hohe Proteinkonzentrationen im Ansatz erforderlich sind.

3.6.3 Bindungsexperimente unter dem Einfluß zweiwertiger Kationen

Da in Abwesenheit divalenter Kationen für *Eco*RI-Mutanten des *Extended Chain*-Motivs keine spezifische DNA-Bindung erreicht werden konnte, wurde versucht, in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen, die Bindungskonstanten zu ermitteln (siehe 2.5.3). Tabelle 14 zeigt die hierauf bestimmten Bindungskonstanten.

Mutante	Bindungskonstante [M^{-1}]
Wildtyp	$4{,}8 \times 10^{9}$
M137A	$1{,}7 \times 10^{8}$
M137E	$3{,}5 \times 10^{7}$
M137H	$4{,}2 \times 10^{7}$
M137I	$3{,}8 \times 10^{7}$
M137Q	$2{,}1 \times 10^{7}$
M137R	$2{,}5 \times 10^{8}$
M137S	$7{,}3 \times 10^{6}$
M137Y	n. d.
G140A	$3{,}1 \times 10^{7}$
G140S	$8{,}0 \times 10^{7}$
A142G	$8{,}0 \times 10^{8}$
A142D	n. d.
A142N	n. d.
A142S	n. d.
M137Q/A142G	n. d.

M137R/A142G	n. d.
M137Q/N141A	n. d.
M137Q/N141A/I197A	n. d.
H114T/M137Q/N141A/I197A	n. d.

Tab. 14: Bindungskonstanten, die im Gel-Retardations-*Assay* in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen bestimmt wurden. Bindungskonstanten, die mit n. d. geken nzeichnet sind, konnten mit diesem Verfahren nicht bestimmt werden.

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, zeigen alle Mutanten mit Aminosäureaustauschen im *Extended Chain*-Motiv eine verminderte Bindungsfähigkeit, die jedoch nur in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen bestimmt werden kann. Da mit Ausnahme der Mutante M137Q auch alle anderen Mutanten gegenüber dem Wildtypenzym eine verminderte, beziehungsweise keine Spaltung zeigen, ist dieses Bindungverhalten zu erwarten. Die vergleichsweise mit ihrer hohen Spaltaktivität schlechte Bindung der Mutante M137Q ist eventuell mit einer durch das Magnesium induzierte Konformationsänderung, die das Kalzium nicht ausübt, zu erklären. Wahrscheinlich macht sich diese Konformationsänderung für die Mutante hinsichtlich ihrer Bindung besonders deutlich bemerkbar.

Einige Doppelmutanten zeigten eine so starke Beeinträchtigung in ihrer Bindungskapazität, daß auch in dieser Methode keine Bindung gemessen werden konnte. Hierbei handelt es sich um ein nicht unerwartetes Ergebnis, da auch alle Mehrfachmutanten, sowie die nicht detektierbaren Einzelmutanten M137Y, A142D und A142N keine spezifische Aktivität zeigten.

4 Diskussion

Die Mutagenese des *Eco*RI-Enzyms an Aminosäurepositionen, die gemäß der Kokristallstruktur hydrophobe Kontakte zur Erkennungssequenz der DNA ausbilden sollen, hatte zum Ziel, die Beteiligung dieser Kontakte zu überprüfen [Rosenberg, 1991]. Mit Hilfe der hieraus gewonnenen Erkenntnisse werden im Anschluß Ansätze zielgerichteter Mutagenese zur Erweiterung beziehungsweise Veränderung der Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease *Eco*RI möglich.

Die durch gezielte Mutagenese der Aminosäurepositionen Met137, Gly140 und Ala142 im *Extended Chain*-Motiv hergestellten Enzymvarianten zeigten bereits in der Untersuchung hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität deutliche Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym. Mit Ausnahme der Mutante M137Q spalten alle Einzelmutanten an den untersuchten Positionen λ-DNA unter Standardbedingungen mindestens um den Faktor 100 langsamer. Für einige Mutanten konnte unter diesen Bedingungen keine Spaltung erzielt werden. Dies ist in der Regel bei einer Substitution der zu untersuchenden Aminosäure durch eine Aminosäure mit erhöhtem Raumbedarf zu beobachten.

4.1 Aminosäureaustausche an der Position Met137

Ein Austausch der Aminosäure Met137 gegen Tyrosin führt zu einem Verlust der sequenzspezifischen Spaltung, was vermutlich auf einer Strukturbeeinflussung aufgrund des oben angesprochenen erhöhten Raumbedarfs der eingeführten Aminosäure beruht. Diese Mutante kann unter der *Star*bedingung erhöhter pH-Wert (8,8) und Niedrigsalzkonzentration im Gegensatz zur Manganbedingung zur spezifischen Spaltung aktiviert werden. Eine *Star*spaltung ist, wie bei allen weiteren Aminosäureaustauschen im *Extended Chain*-Motiv, mit Ausnahme der Mutante M137Q nicht zu erreichen.

Die Aminosäureaustausche an dieser Position zu Arginin, Histidin und Glutaminsäure führen ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung der spezifischen Aktivät. Diese Mutanten zeigen wie M137Y eine Aktivierung der Spaltaktivität bei einer Erhöhung des pH-Wertes in Verbindung mit einer Verminderung der Salzkonzentration. Diese Phänomene werden ebenfalls einer Strukturbeinflussung aufgrund des erhöhten Raumbedarfs der eingeführten Aminosäure zugeschrieben. Für die Histidinmutante ist die mögliche Ausbildung diverser Wasserstoffbrücken-

ckenbindungen beziehungsweise hydrophober Kontakte unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten Konformation in Abbildung 18 dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, befindet sich der Histidinrest in einer äußerst starren Konformation, die sowohl durch den erhöhten Raumbedarf, als auch durch die mögliche Ausbildung einer Vielzahl von Kontakten bedingt ist. Die Aufnahme eines pH-Spektrums der Mutante M137H ergibt eine achtfache Erhöhung der Spaltaktivität auf λ-DNA bei einer schrittweisen pH-Werterhöhung von 7,5 auf 9,4 unter Niedrigsalzbedingungen. Diese erhöhte Spaltaktivität im alkalischen Medium wird auf eine Deprotonierung des Histidinrestes unter diesen Bedingungen zurückgeführt. Bei einem pH-Wert unter 7,0 zeigte diese Mutante keine Spaltaktivität mehr. Ferner fand eine deutliche Diskriminierung zwischen den Spaltstellen auf dem Substrat λ-DNA hinsichtlich ihrer Spaltgeschwindigkeiten statt. Ein Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeiten durch das die Erkennungssequenz flankierende Basenpaar konnte durch Spaltexperimente mit selbstkomplementären Oligonukleotiden ausgeschlossen werden. Vermutlich spielen weitere Einflüsse auf Substratebene (spezifische Konformationen des makromolekularen Substrates an den kanonischen Sequenzen, Einflüsse von mehr als einem Nukleotid flankierend zur Erkennungssequenz), wie auch auf Enzymebene (Dissoziation vom Substrat als geschwindigkeitsbestimmender Schritt) eine Rolle in der Diskriminierung der Mutante hinsichtlich der Spaltstellen auf λ-DNA.

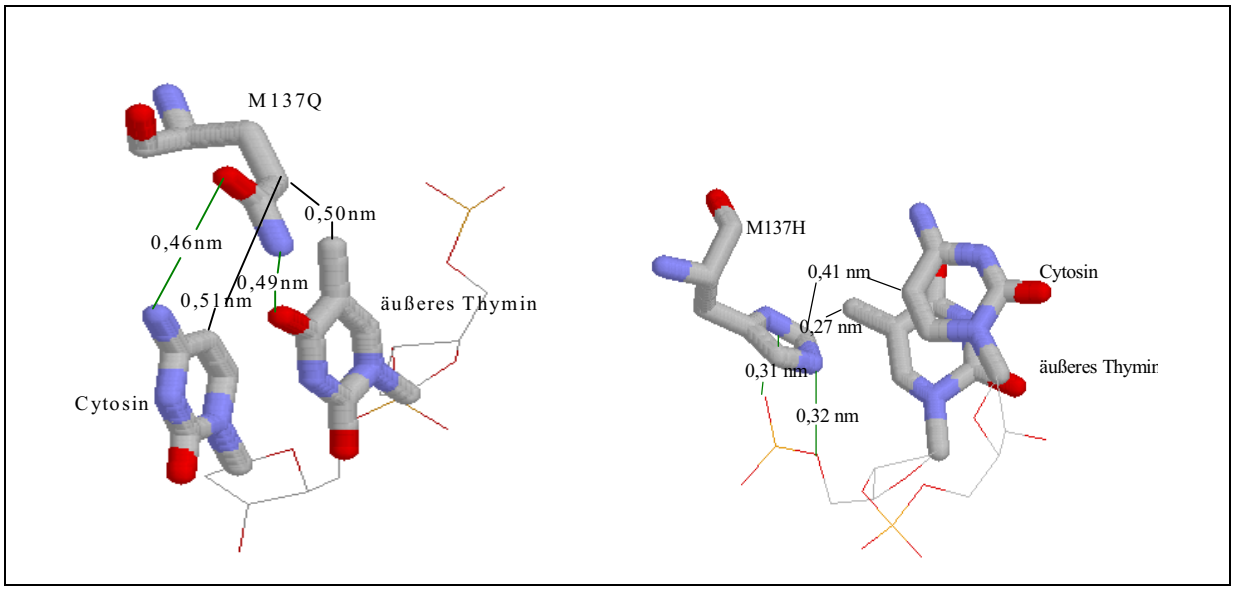

Abb. 18: Durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „PDB View“ dargestellte Aminosäureaustausche von Met137 zu Gln beziehungsweise His unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten Konformation des eingeführten Aminosäurerestes und unter Beibehaltung der Konformation aller anderen Aminosäuren

Die zweifellos ungewöhnlichste Mutante an dieser Position ergibt der Aminosäureaustausch von Met137 zu Gln (siehe Abbildung 18). Diese Mutante unterscheidet sich von allen anderen Mutanten im *Extended Chain*-Motiv durch ihre außerordentlich hohe spezifische Aktivität, sowie das Auftreten von *Star*spaltung unter den entsprechenden Bedingungen. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, ist der Glutaminrest sowohl mit seiner Aminogruppe, als auch mit seiner Carbonylgruppe potentiell in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung zur exozyklischen Aminogruppe des Cytosins und mit der Carbonylgruppe des äußeren Thymins auszubilden. Zusätzlich ist, bedingt durch den dargestellten Abstand von 0,51nm zwischen der β-Methylengruppe der Seitenkette und dem C5 des Cytosins, die Möglichkeit gegeben, durch eine Modifikation (5-Methyl-Cytosin) einen zusätzlichen hydrophoben Kontakt einzuführen.
Diese Kontakte wurden durch Spaltungen der Mutante M137Q mit substituierten Oligonukleotiden überprüft. Hier wurde das Cytosin der Erkennungssequenz gegen 5-Methyl-Cytosin, Uracil oder Thymin ausgetauscht. Dieser Austausch fand nur in einem der beiden Stränges des Oligonukleotids statt. Durch radioaktive Markierung nur eines der beiden Stränge war eine Unterscheidung der Spaltung beider Einzelstränge möglich. Das Spaltverhalten auf dem modifizierten Strang ist, wie in Abbildung 19 gezeigt wird, dabei immer in Zusammenhang mit dem Spaltverhalten auf dem unmodifizierten Strang zu sehen, da eine Konformationsänderung im Substrat eine Auswirkung auf beide Untereinheiten des Enzyms haben kann. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Modifikation in einem Strang an der Cytosinposition die Erkennung der einen Untereinheit direkt beeinflußt. Diese Position befindet sich jedoch auch direkt gegenüber des katalytischen Zentrums der anderen Untereinheit, die zwischen dem komplementären Guanin und dem angrenzenden Adenin spaltet. Eine weitere Beeinflußung dieser Untereinheit besteht in der Monomer-Monomer-Wechselwirkung der beiden Untereinheiten, die beispielsweise durch Arg145 und Glu144 ausgebildet werden. Eine weitere zentrale Rolle in der Erkennung und Katalyse wird auch in diesem Zusammenhang dem Gln115 zugeschrieben. Über diese Aminosäure findet die Beeinflussung der Katalyse der direkt an der Erkennung beteiligten Untereinheit statt. Die Abbildung 19 zeigt die möglichen Wege der Kopplung zwischen Erkennung und Katalyse der eigenen beziehungsweise der anderen Untereinheit.

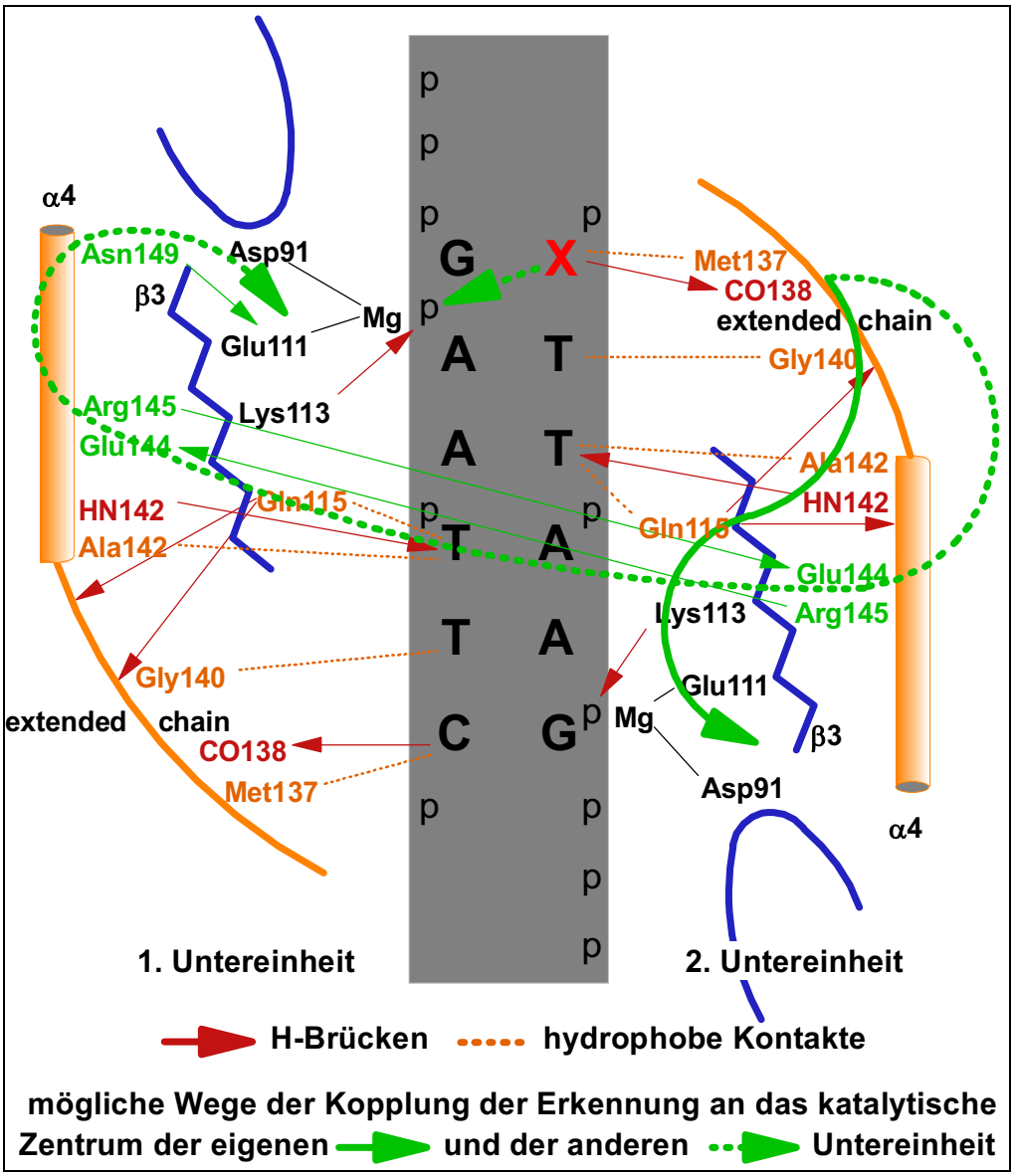

Abb. 19: Kopplung der Erkennung und Katalyse beider *Eco*RI Untereinheiten

Die modifizierten Oligonukleotide haben nun folgende Auswirkungen auf die Erkennung durch *Eco*RI beziehungsweise Mutanten an Position 137: Das 5-Methyl-Cytosin behindert sterisch den Kontakt zum Methionin im Wildtypenzym, ermöglicht aber die Ausbildung eines hydrophoben Kontaktes von Seiten des Substrates für Mutanten mit Aminosäureaustauschen, die aufgrund mangelnder Länge der Aminosäureseitenkette diesen Kontakt nicht mehr ausbilden können. Das Thymin ermöglicht durch seine Methylgruppe an der C5-Position ebenfalls die Ausbildung eines solchen neuen hydrophoben Kontaktes, verhindert jedoch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung mit Ala138. Letzteres gilt auch für eine Substitution durch Uracil, wobei der ursprüngliche Kontakt zum Methionin jedoch möglich ist.

Die Mutante M137Q spaltet die Substitutionen von Cytosin der Erkennungssequenz durch Uracil oder Thymin schneller als eine Substitution durch 5-Methyl-Cytosin oder das unmodifi-

zierte Substrat. Die erhöhte Spaltgeschwindigkeit für die Thyminmodifikation gegenüber dem Grundoligonukleotid zeigte sich sowohl für den modifizierten als auch den unmodifizierten Strang (siehe Abbildung 22). Das Verhalten spricht dafür, daß zwar nicht ein zusätzlicher hydrophober Kontakt durch die Einführung einer Methylgruppe an der C5-Position des Cytosins ausgebildet wird, jedoch bildet diese Mutante wahrscheinlich neue Kontakte zur Carbonylgruppe dieser Basen aus, die die beiden ursprünglichen Kontakte nicht nur kompensieren, sondern eine Optimierung gegenüber dem kanonischen Substrat darstellen. M137Q stellt also einen möglichen Ausgangspunkt für die Einführung weiterer Aminosäureaustausche zur Erweiterung oder Änderung der Sequenzspezifität von *Eco*RI dar.

Auch eine Substitution durch Aminosäuren mit geringerem Raumbedarf (Alanin, Serin oder Isoleucin) führt zu einer Verminderung der spezifischen Aktivität um den Faktor 100. Diese Aminosäuren sind nicht mehr in der Lage den hydrophoben Kontakt auszubilden, was zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität führt. Eine Abnahme der spezifischen Aktivität in dieser Größenordnung spricht für die Ausbildung eines hydrophoben Kontaktes durch das Methionin an der Position 137. Allerdings ist der nahezu identische Effekt bei einer Substitution durch Isoleucin und durch Alanin erstaunlich, da Isoleucin einen dem Methionin vergleichbaren Raumbedarf hat. Vermutlich liegt dieses Verhalten in dem Einfluß der β-Methylgruppe von Isoleucin, die eine für einen hydrophoben Kontakt notwendige Konformation verhindert, begründet. Die Mutanten M137I und M137A wurden zusätzlich hinsichtlich ihres Spaltverhaltens mit den gleichen modifizierten Oligonukleotiden wie M137Q untersucht. Wie unter 1.2.5.1 bereits erwähnt, wird das Cytosin der Erkennungssequenz nicht nur von einem hydrophoben Kontakt durch das Met137 sondern auch durch eine Wasserstoffbrückenbindung von Ala138 mit dessen exozyklischer Aminogruppe erkannt.

Das Wildtypenzym diskriminiert deutlich zwischen dem kognaten, unmodifizierten Doppelstrang und allen an Stelle des Cytosins eingebrachten Modifikationen. Im Gegensatz dazu, trifft die Mutante M137I keine Unterscheidung zwischen den vier Substraten bei Betrachtung der Spaltgeschwindigkeiten für den modifizierten Strang. Betrachtet man das Spaltverhalten auf dem unmodifizierten Strang, so zeigt diese Mutante, wie auch das Wildtypenzym eine Präferenz von Cytosin gegenüber den modifizierten Basen, wobei sie jedoch eine stärkere Unterscheidung gegenüber dem methylierten Cytosin im Vergleich zum Uracil trifft. Dieses Verhalten könnte auf eine Konformation des Aminosäurerestes, der die Wasserstoffbrückenbindung des Ala138 schwächt, hinweisen.

Die Mutante M137A bevorzugt ebenfalls das Cytosin, was darauf hindeutet, daß die Wasser-

stoffbrückenbindung zum Ala138 intakt bleibt. Die Diskriminierung gegenüber 5-Methyl-Cytosin könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Alaninrest zu klein ist, um die gestörte hydrophobe Wechselwirkung durch Einführung einer Methylgruppe auf der Substratseite erneut zu bilden. Ein mit Hilfe des Computerprogramms „PDB View“ simulierter Aminosäureaustausch von Methionin durch Isoleucin oder Alanin, unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten Konformation des Aminosäurerestes, zeigt, daß sich sowohl die Methylgruppe des Alanins, als auch die endständige Methylgruppe des Isoleucins, dem C5 des Cytosins höchstens bis auf 0,62nm annähern (siehe Abbildung 20).

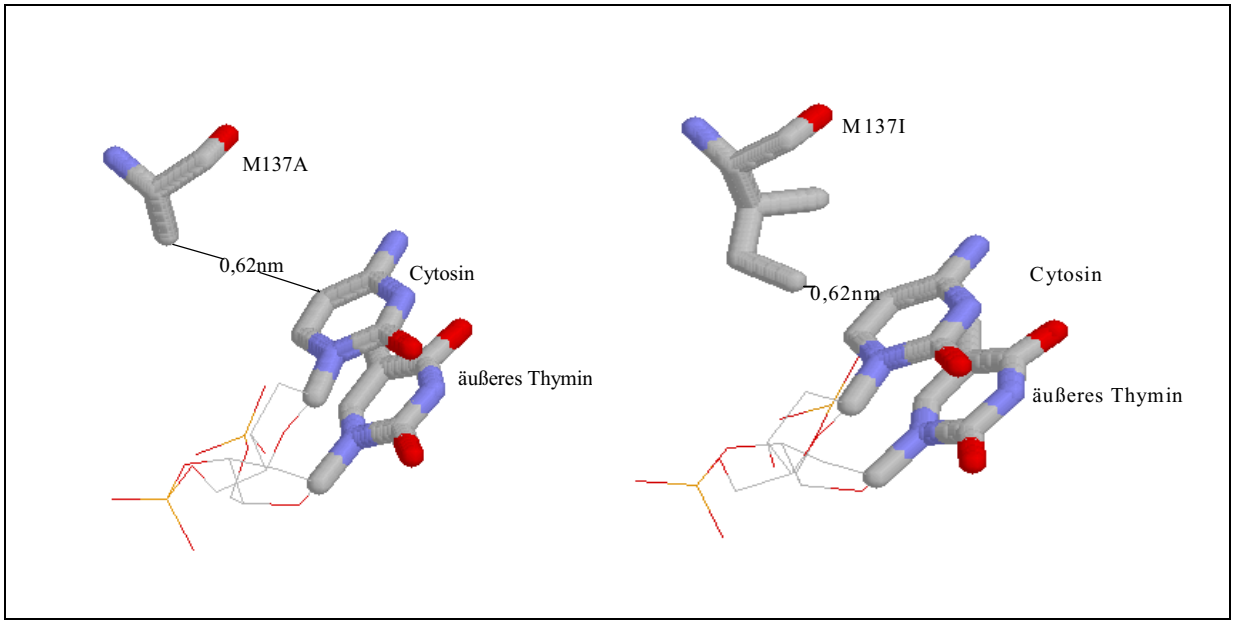

Abb. 20: Durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „PDB View“ dargestellte Aminosäureaustausche von Met137 zu Ala beziehungsweise Ile, unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten Konformation des eingeführten Aminosäurerestes und unter Beibehaltung der Konformation aller anderen Aminosäuren

Die Einführung einer Methylgruppe auf der Substratseite bewirkt bei optimaler Orientierung der Aminosäurenseitenkette eine Abstandsverminderung um 0,145nm, wodurch der Abstand auf 0,475nm sinkt. Vermutlich können weder die Alanin-, noch die Isoleucinmutante auf diese Entfernungen keinen hydrophoben Kontakt zum 5-Methyl-Cytosin ausbilden, wobei bei der Isoleucinmutante vermutlich zusätzlich der störende Einfluß der β-Methylgruppe zum Tragen kommt.

4.2 Aminosäureaustausche an den Positionen Gly140 und Ala142

Die Bedeutung des Aminosäurerestes Glycin an Position 140 läßt sich aufgrund der Größe des Glycinrestes nur sehr schwer untersuchen. Eine Substitution durch die nur geringfügig größeren Aminosäuren Alanin oder Serin führt bereits zu einem deutlichen Abfall beziehungsweise kompletten Verlust der spezifischen Aktivität. Diese Tatsache spricht für die Existenz eines hydrophoben Kontaktes. Andererseits kann auch Raummangel, der es nicht ermöglicht an dieser Position eine größere Aminosäure einzuführen, den deutlichen Verlust an spezifischer Aktivität verursachen (siehe Abbildung 21, circa 0,3nm ist deutlich zu kurz für einen hydrophoben Kontakt). Durch Vermessung des Abstandes von Gly140 mit dem äußeren und inneren Thymin der Erkennungssequenz wird die Vermutung gestützt, daß das Glycin an dieser Position, aufgrund der ähnlich räumlichen Entfernung nicht nur einen hydrophoben Kontakt zum äußeren Thymin, sondern auch zum inneren Thymin bilden könnte (siehe Abbildung 10 und auch Abbildung 21). Aufgrund der Röntgenstrukturdaten ergibt sich ein Abstand von Gly140 zum äußeren Thymin der Erkennungssequenz von 0,41nm und zum inneren Thymin von 0,40nm. Dieser zweite Kontakt ist jedoch nach der Röntgenstrukturuntersuchung nicht postuliert worden [Rosenberg, 1991].

Beide Kontakte wurden durch Substitution des jeweiligen Thymins durch Uracil überprüft. Wie in früheren Experimenten gezeigt wurde, unterscheidet das Wildtypenzym nur unwesentlich zwischen Thymin und Uracil an diesen Positionen [Fließ *et al.*, 1986]. Die Mutante G140A hingegen bevorzugt uracilsubstituierte Substrate gegenüber unmodifizierten Oligonukleotiden mit einem Faktor von 10. Diese Präferenz gilt für Substitutionen an beiden Thyminpositionen innerhalb der Erkennungssequenz, so daß auf diese Weise der postulierte hydrophobe Kontakt bestätigt und ein zusätzlicher hydrophober Kontakt des Glycins 140 zum inneren Thymin der Erkennungssequenz nachgewiesen werden konnte.

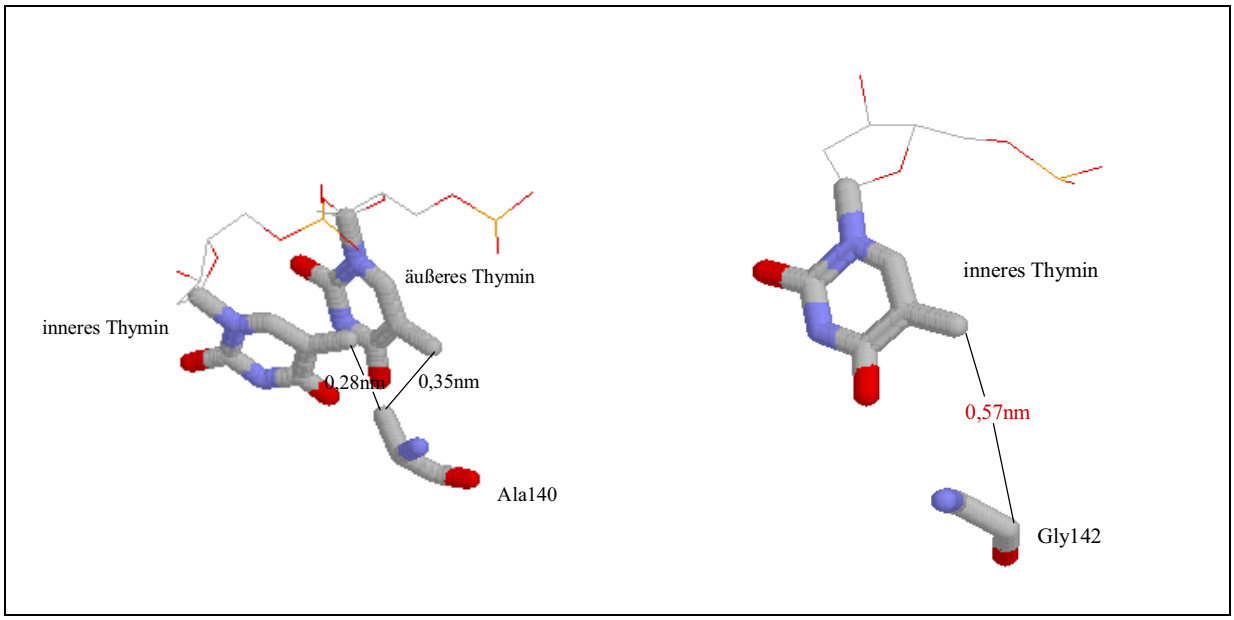

Abb. 21: Durch Computersimulation unter Verwendung des Programms „PDB View“ dargestellte Aminosä u-reaustausche von Gly140 zu Ala beziehungsweise Ala142 zu Gly, unter Berücksichtigung der ene r-getisch günstigsten Konformation des eingeführten Aminosäurerestes unter Beibehaltung der Ko n-formation aller anderen Aminosäuren

Die Bedeutung des hydrophoben Kontaktes von Alanin an der Position 142 mit dem inneren Thymin wird bereits im starken Abfall der spezifischen Aktivität der Mutante A142G (etwa um den Faktor 1000 im Vergleich zum Wildtypenzym) deutlich. Eine Substitution durch die etwas größere Aminosäure Serin führt zu einem Verlust an spezifischer Aktivität um den Faktor 100. Die Einführung der noch größeren Aminosäuren Asparagin und Aspartat, die zusätzlich hydrophile funktionelle Gruppen besitzen, bewirkt einen kompletten Verlust der spezifischen Aktivität.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Tatsache, daß die Mutante A142G auf Oligonukleotidebene weiterhin den Thyminrest in der Erkennungssequenz einer Uracilsubstitution vorzieht. Dies beruht vermutlich auf der Tatsache, daß der Thyminrest im Gegensatz zum Uracilrest ebenfalls durch die Aminosäure Gln115 und Gly140 kontaktiert wird (siehe 1.2.5.4). Eine Zusammenfassung der Spaltexperimente mit substituierten Oligonukleotiden ist in Abbildung 22 dargestellt.

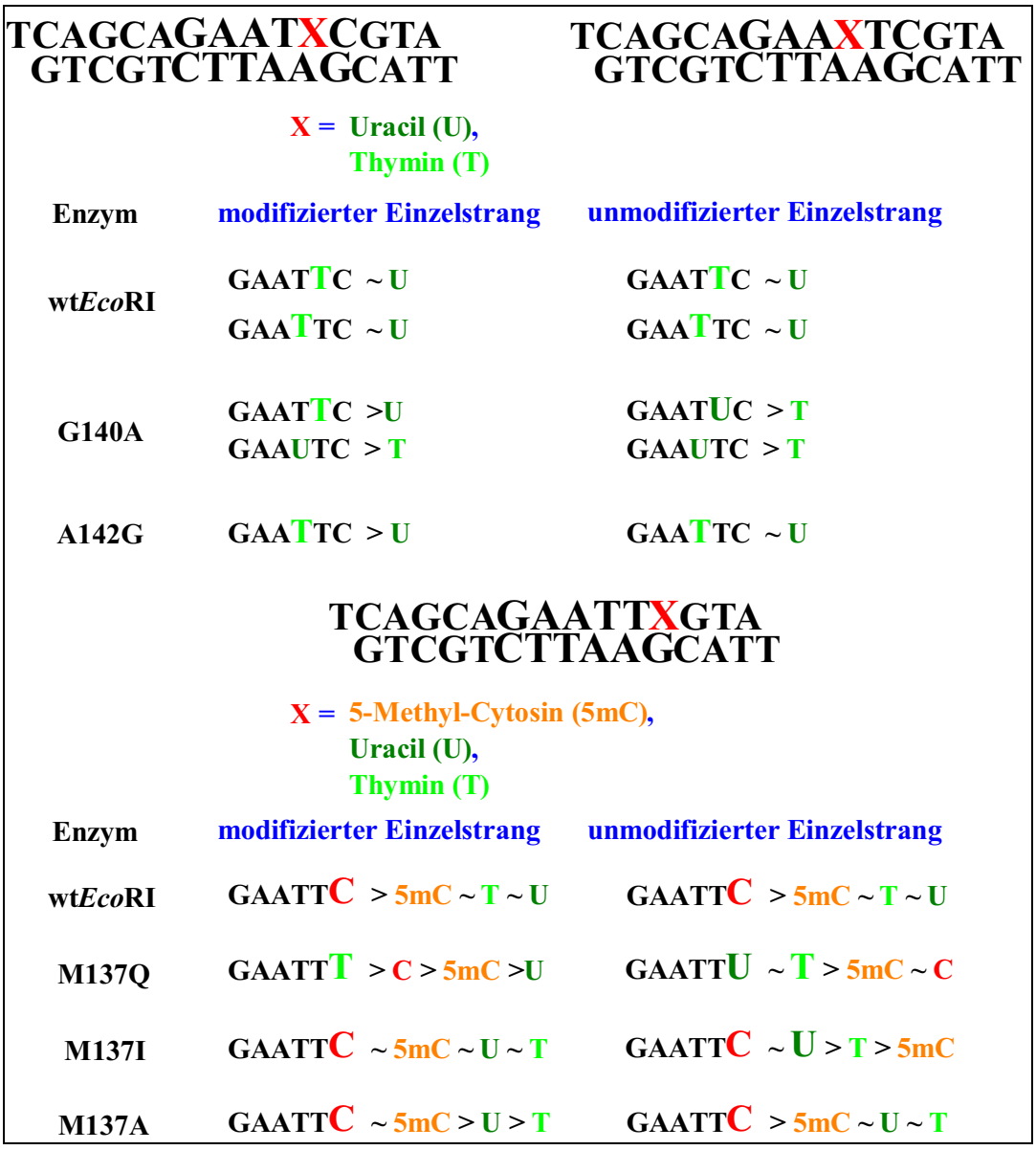

Abb. 22: Zusammenfassung der Spaltexperimente mit substituierten Oligonukleotiden

Die Spaltexperimente mit Oligonukleotiden, die an den kontaktierten Basen modifiziert sind, sind eine notwendige Ergänzung zur zielgerichteten Mutagenese. Erst aus dem Vergleich der Ergebnisse, die durch Störung eines Kontaktes sowohl auf der DNA- als auch auf der Enzymseite erzielt werden, kann tatsächlich auf seine Bedeutung geschlossen werden. Allerdings sind dazu die durchgeführten Spaltexperimente bei konstanter Oligonukleotidkonzentrationen im wesentlichen nur qualitativ zu werten, da impliziert wird, daß die Substratkonzentration ausreicht, um die Sättigung des eingesetzten Enzyms zu erreichen. Konsequenterweise müßten Michaelis-Menten-Untersuchungen durchgeführt und k_{kat}/K_M-Werte verglichen werden. Dafür eignen sich jedoch die lediglich in einem Strang modifizierten Oligonukleotide mit ihren unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten und dem asymmetrischen Enzym/Substrat-Komplex nur schlecht. Die Synthese selbstkomplementärer, modifizierter Oligonukleotide ist vorgesehen.

Die Michaelis-Menten-Experimente mit der Vielzahl der Mutanten werden sich jedoch noch über einen längeren Zeitraum hinziehen.

Trotz dieser Einschränkung kann festgestellt werden, daß die untersuchten Aminosäuren Met137, Gly140 und Ala142 über die Ausbildung hydrophober Kontakte zu den Pyrimidinen der Erkennungssequenz signifikant zur Sequenzspezifität der *Eco*RI-Endonuklease beitragen. Das gilt insbesondere für Gly140, das im Gegensatz zu den aus der Röntgenstruktur abgeleiteten Postulaten nicht nur aufgrund mangelnden Raumes an dieser Position steht.

4.3. Mehrfachmutanten zur Änderung oder Erweiterung der Spezifität

Um die Sequenzspezifität von *Eco*RI zu erweitern oder zu ändern, wurden diverse Aminosäureaustausche in Kombination durchgeführt, deren Einzelmutationen einer vorhergehenden Charakterisierung unterzogen wurden. Da unterschiedliche Ansätze zur Erweiterung oder Änderung der Sequenzspezifität von Restriktionsendonukleasen bisher nicht zu dem gewünschten Erfolg führten [Fritz, 1994; Grabowski, 1998], wurde folgende Strategie verfolgt: Das Enzym nimmt die Möglichkeit der Ausbildung neuer Bindungen, die durch Aminosäureaustausche möglich sein können, nur bedingt wahr, da sie für eine effektive Erkennung und Spaltung nicht zwingend notwendig sind [Küster, 1995]. Die Möglichkeit neue Bindungen zu nutzen, sollte verbessert werden, wenn diese gleichzeitig mit einem Verlust von bisherigen Bindungen einhergehen, um dem Enzym den Druck aufzulegen, die Möglichkeit der zusätzlichen Bindungsbildung wahr zu nehmen. Aufgrund der bereits angesprochenen Kopplung von Bindung und Katalyse ist jedoch der Verlust von Bindungen, die das Wildtypenzym ursprünglich einging, immer mit einem Verlust der Spaltaktivität gekoppelt. Um diesem Verlust entgegenzuwirken, wurden Mutationen eingebracht, die eine Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym bewirken.

4.3.1 Aminosäureaustausche an Positionen, die in der Herstellung von Mehrfachmutanten Anwendung finden

4.3.1.1 Die Mutante H114T

Bei der Mutante H114T handelt es sich um ein bereits von einer anderen Arbeitsgruppe charakterisiertes Enzym [Flores *et al.*, 1995]. Die beschriebene hohe spezifische Aktivität konnte bestätigt werden. Ferner zeigte diese Mutante das Phänomen, daß sie selbst unter Standardbedingungen nach kurzer Zeit in weitaus geringeren Konzentrationen, als für das Wildtypenzym zu beobachten ist, ein *Star*spaltmuster erzeugt. Das Bindungsverhalten dieser Mutante war dem des Wildtypenzym vergleichbar. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität dieser Aminosäuresubstitution fand sie in Mehrfachmutanten Anwendung (siehe 4.4.5).

4.3.1.2 Die Mutante I197A

Die Mutante I197A wurde zu Beginn dieser Arbeit hergestellt, um die Ausbildung eines hydrophoben Kontaktes des Isoleucin 197 zum Cytosin der Erkennungssequenz auszuschließen. Diese Mutante zeigte eine gegenüber dem Wildtypenzym erhöhte spezifische Aktivität, die auch mit steigendem pH-Wert im Gegensatz zum Wildtypenzym konstant blieb. Das Bindungsverhalten dieser Mutante war vergleichbar mit dem Wildtypenzym. Aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität, die auch bei alkalischem pH-Wert nicht abnahm, wurde dieser Aminosäureaustausch in Mehrfachmutanten angewendet (siehe 4.4.4 und 4.4.5).

4.3.1.3 Die Mutante N141A

Asn141 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu beiden Adeninen der Erkennungssequenz aus. Bei der Mutante N141A handelt es sich um eine der von Herrn Dr. A. Fritz [Fritz, 1994] hergestellten und charakterisierten Aminosäurevarianten. Sie ist sowohl in ihrem DNA-Bindungsverhalten, als auch in ihrer Spaltgeschwindigkeit stark beeinträchtigt. Die Mutante zeigt nur unter bestimmten Bedingungen (0,75mM $MnCl_2$ anstelle von Magnesium) das Auftreten des kanonischen Spaltmusters mit einer geringen Aktivität (1,5 x 10^2U/mg). Hier ist offensichtlich die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen unterbunden. Dieser Aminosäureaustausch wurde in der Herstellung von Mehrfachmutanten angewendet, da hierdurch dem Enzym ein Druck zur Ausbildung neuer Kontakte auferlegt werden sollte.

4.3.1.4 Die Mutante A142G

Hierbei handelt es sich um eine oben bereits erwähnte Mutante, auf die unter diesem Punkt

nicht näher eingegangen werden soll. Grund der Einführung dieses Aminosäureaustausches ist auch hier die Schwächung der Erkennung durch Unterbindung des bereits erwähnten hydrophoben Kontaktes von Ala142 zum inneren Thymin der Erkennungssequenz.
Ferner wurde in den untersuchten Mehrfachmutanten der bereits angesprochenen Aminosäureaustausche von Met137 zu Gln beziehungsweise Arg angewendet. Das Arginin mit seinem großen Wasserstoffbrückenbindungspotential stellt einen geeigneten Kandidaten an der Position 137 in der Nähe der die Erkennungssequenz flankierenden Basen dar. Hiervon versprachen wir uns die oben bereits angesprochene Ausbildung neuer Kontakte.

4.3.2 Charakterisierung von Mehrfachmutanten

4.3.2.1 Die Mutante M137R/A142G

Diese Doppelmutante verspricht die Nutzung des großen Wasserstoffbrückenbindungspotentiales von Arginin am 3'-Ende der Erkennungssequenz in Verbindung mit der Schwächung der spezifischen Erkennung innerhalb des *Extended Chain*-Motivs durch Substitution des Alanins durch Glycin. Leider zeigt diese Doppelmutante keine meßbare Spaltktivität. Aufgrund der bereits erwähnten Kopplung von Erkennung und Katalyse addieren sich die negativen Einflüsse beider Einzelmutanten

4.3.2.2 Die Mutante M137Q/A142G

Aufgrund des Verhaltens der Doppelmutante M137R/A142G (siehe 4.3.2.1) wurde die Einzelmutation M137Q anstelle von M137R verwendet. Sie zeigte eine gegenüber dem Wildtypenzym erhöhte spezifische Aktivität und ist vermutlich in der Lage, neue Wechselwirkungen zu Basen auszubilden, wie die Spaltuntersuchungen an substituierten Oligonukleotiden zeigen. Die Doppelmutante zusammen mit A142G zeigte unter Standard- und Manganbedingungen lediglich die Andeutung spezifischer Banden mit einer geringen Aktivität. Unter pH-*Star*-bedingungen entstand ein kanonisches Spaltmuster mit einer Aktivität von 5,8 x 10^3U/mg. Hier wird das für viele Einzelmutanten im *Extended Chain*-Motiv beobachtete Verhalten der Aktivierung unter pH-*Star*bedingungen deutlich. Eine Änderung oder Erweiterung der Spezifität konnte jedoch auch mit dieser Doppelmutante nicht beobachtet werden.

4.3.2.3 Die Mutante M137Q/N141A

Eine weitere Möglichkeit der Schwächung in der kognaten Erkennung stellt die Substitution

von Asn141 durch Ala dar. Da bei der Spaltung von λ-DNA durch die Einzelmutante N141A lediglich unter bestimmten Bedingungen das kanonische Spaltmuster auftritt, wird die Störung der Erkennung durch den Austausch an Position 141 gegenüber des Austausches an Position 142 erhöht.

Die Spaltung von λ-DNA durch diese Mutante, zeigt unter *Star*bedingungen das Auftreten lediglich einer Bande vor einem Hintergrund unspezifischer Abbauprodukte. Hierbei handelt es sich um die λ-*Site* D, deren um ein Basenpaar erweiterte Sequenz ebenfalls palindromen Charakter aufweist (-AGAATTCT-). Diese Schnittstelle wurde von der Mutante jedoch nur mit einer geringen Aktivität gespalten. Mit dieser Doppelmutante wurde die Spaltung eines pUC8-*Randompools* durchgeführt, die jedoch nicht zu der erhofften Anreicherung bestimmter Sequenzen an den drei, die kanonische Sequenz flankierenden Basen führte. Dieses Ergebnis erstaunt, da selbst wenn kein direkter Kontakt zum Thymin hinter der Erkennungssequenz ausgebildet wird, die starke Selektivität auf einer Einflußnahme durch Seitensequenzen beruhen muß. Es bleibt die Möglichkeit, daß eine erfolgte Anreicherung sich nicht in der Sequenzierung des gesamten *Pools* zeigt. Dies würde bedeuten, daß sehr unterschiedliche Sequenzen eine gleichartige Beeinflussung der Aktivität der Doppelmutante bewirken, die sich in der Sequenzierung zu Signalen für alle Basen addieren. Ein deutlicher Nachteil dieser Mutante bleibt aber ihre sehr geringe Aktivität, die durch weitere Mutation gesteigert werden sollte.

4.3.2.4 Die Mutante M137Q/N141A/I197A

Da die Spaltung der λ-*Site* D durch die Mutante M137Q/N141A nur unter bestimmten Bedingungen im alkalischen pH-Bereich detektiert werden konnte, und diese Spaltung nur mit geringer Aktivität stattfand, wurde zusätzlich die Aminosäure Ile197 durch Alanin substituiert. Hiervon versprachen wir uns eine Erhöhung der Aktivität ohne Verlust der bereits gewonnenen Selektivität.

Diese Dreifachmutante weist jedoch keinerlei spezifische Aktivität auf. Die Spaltung von λ-DNA zeigt bei langen Zeitwerten bei den untersuchten Bedingungen lediglich das Auftreten unspezifischer Degradation

4.3.2.5 Die Mutante M137Q/N141A/I197A/H114T

Um die Aktivität der unter 4.3.2.4 aufgeführten Dreifachmutante zu erhöhen, wurde das His114 gegen Thr ausgetauscht.

Unter Standard- und Manganbedingungen zeigte diese Mutante bei einer Spaltung von λ-DNA ebenfalls nur das Auftreten unspezifischer Abbauprodukte. Unter pH-*Star*bedingungen deutete sich jedoch vor einem starken Hintergrund von Schmier mit einer geringen Aktivität ein Spaltmuster an, das nicht dem kognaten Spaltmuster von *Eco*RI entsprach. Dieses Phänomen gilt es in weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

4.3.3 Weiterführende Ansätze zur Erweiterung oder Änderung der Sequenzspezifität

Die hier verfolgte Strategie zur Erweiterung oder Änderung der Spezifität von *Eco*RI durch eine Schwächung der kognaten Kontakte in Verbindung mit Aminosäureaustauschen, die als Einzelmutanten eine Erhöhung der spezifischen Aktivität zur Folge haben und der Einführung von Aminosäuren mit hohem Bindungspotential zu Positionen neben der kanonischen Sequenz, sollte grundsätzlich weiter verfolgt werden. Der zunächst gewählte Ansatz der Substitution von Asn141 durch Ala hat jedoch einen zu starken Einfluß auf Erkennung und Katalyse. Hier scheint eine Substitution zu Ser angebrachter, da die entsprechende Einzelmutante nicht so stark in ihrer spezifischen Aktivität vom Wildtypenzym abweicht und weniger stringent in ihren Anforderungen an die Pufferbedingungen ist.

Unter Einbeziehung der Position 137 in Mehrfachmutanten zur Spezifitätserweiterung oder Änderung der Spezifität stellt der Aminosäureaustausch von Met nach Gln einen guten Ausgangspunkt dar. Die Mutante ist, wie in Spaltergebnissen von modifizierten Oligonukleotiden zu sehen, potentiell in der Lage, einen Kontakt zu einem Thymin an der C-Position der Erkennungssequenz zu bilden. Dadurch kann durch das Protein die neue fehlende Kontaktmöglichkeit von Ala138 zum Cytosin kompensiert werden. Ein solcher Kontakt hat zur Folge, daß zu einer letztendlichen Spezifitätsänderung zusätzlichen auf dem komplementären Strang eine Erkennungsänderung von Guanin zu Adenin folgen müßte. Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, wird dieses Guanin durch die Aminosäuren Arg200 und Arg203 über wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen kontaktiert. Aufgrund des Abstandes dieser Aminosäuren zur DNA ist es schwierig, von dieser Position einen neuen Kontakt zur DNA auszubilden. Es bietet

sich lediglich ein Austausch durch Lysin an, da gleichzeitig von Arg203 ein Phosphatkontakt ausgebildet wird. Eine Beeinflussung dieser Kontakte hatte jedoch in den Aminosäureaustauschen nach Lysin einen geringen (R203K) beziehungsweise starken (R200K) Verlust der spezifischen Aktivität zur Folge, beide Einzelmutanten zeigten dabei keine Spezifitätsänderung [Geiger *et al*., 1989a; Oelgeschläger, 1992]. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß Arg200 in ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist, das letztlich in Einflüssen via das *Extended Chain*-Motiv und die Helix α4 auf die Aminosäure Glu144 resultieren, und damit an der Monomer-Monomer-Wechselwirkung beteiligt sind. Es bleibt experimentell zu überprüfen, ob die Mutation einer oder beider Positionen ausreicht, um in Verbindung mit der Mutante M137Q die Spezifität zu ändern.

Einige Effekte der Einzelmutanten lassen sich so deuten, daß mehr Raum für die globale Beeinflussung durch die Erkennungssequenz flankierende Sequenzen gegeben wird. Es stellt sich die Frage, ob die Position 137 allein geeignet ist, neue Kontakte außerhalb der Erkennungssequenz einzugehen. Weitere Kandidaten für die Einführung neuer Kontakte sind Ala138 und/oder Ile197, deren Seitenketten im Kristall innerhalb der großen Grube der DNA liegen, ohne wirklich Kontakte mit Basen einzugehen. Allerdings kann eine Substitution von Ala138 auch zur Schwächung der spezifischen Erkennung innerhalb des *Extended Chain*-Motivs führen, da ihre Carbonylfunktion der Hauptkette eine Wasserstoffbrücke zum Cytosin ausbildet. Ein Austausch von Ile197 durch Arg sollte aufgrund des hohen Wasserstoffbrückenbindungspotentials dieser Aminosäure die Möglichkeit zur Neubildung von Kontakten innerhalb der großen Grube an einer Position in der Nähe der die Erkennungssequenz flankierenden Basen bieten. Von der Einzelmutante ist bekannt, daß sie keinen Verlust in ihrer spezifischen Aktivität, jedoch auch keine Spezifitätsänderung zeigt [Küster, 1995]. Es ist daher auch zu beachten, solche Seitenketten durch unterstützende Mutationen in das Wasserstoffbrückennetzwerk der anderen, die DNA kontaktierenden Aminosäuren einzubinden.

Trotzdem ist damit zu rechnen, daß Mehrfachmutanten unter einem deutlichen Einbruch der katalytischen Aktivität leiden werden. Neben H114T könnte eine Erhöhung der spezifischen Aktivität in einer Mehrfachmutante, auch durch die Einführung eines Aminosäureaustausches zu His an der Position Asn199, erhalten werden. Die Einzelmutante ist bereits hergestellt und mit einer zum Wildtypenzym erhöhten spezifischen Aktivität charakterisiert worden [Kim *et al*., 1996].

Ein Ansatz zur Spezifitätsänderung könnte die Entfernung aller Kontakte, die vom Protein zu einer einzelnen Base der Erkennungssequenz ausgebildet werden, sein. Dabei stellt das bereits

erwähnte Netzwerk von Kontakten zur kognaten Erkennungssequenz in Verbindung mit Phosphatkontakten zum Rückgrat der DNA und intermolekularen Wechselwirkungen ein weiteres Problem dar. Bezogen auf das innere Thymin der Erkennungssequenz, müßten hier die Kontakte zum Gln115, Gly140 und Ala142 unterbrochen werden. Dies wiederum stößt vermutlich aufgrund der oben bereits angesprochenen Kopplung von Erkennung und Katalyse auf zusätzliche Schwierigkeiten hinsichtlich der katalytischen Aktivität.
Es gibt also eine Vielzahl von Möglichkeiten, durch gezieltes Proteindesign die Spezifitätsänderung einer Endonuklease zu erreichen. Dabei tragen auch die ersten erfolglosen Versuche, die hier beschrieben worden sind, zu einem vertieften Verständnis des Enzyms und seiner zusätzlichen Wechselwirkungen mit ihrem Substrat bei.

4.4 DNA-Bindungsmessungen von Mutanten mit Aminosäureaustauschen im *Extended Chain*-Motiv

Aufgrund der schwachen Wechselwirkungen von Mutanten mit Aminosäureaustauschen im *Extended Chain*-Motiv mit DNA, war es in einem Gel-Retardations-*Assay* nicht möglich die Bindung einer dieser Mutanten zu detektieren. Durch Variation des Bindungs- und des Laufpuffers konnten weder die Bindungseigenschaften des Wildtypenzyms noch der Mutanten wesentlich verbessert werden. Durch eine Vergrößerung des Ansatzvolumens (von 10µl auf 40µl) konnte jedoch eine Verdreifachung der Bindungskonstante erzielt werden. Auf diese Weise wurde die Bindungskonstante zu 2 x $10^8 M^{-1}$ bestimmt. Aufgrund von Ultrazentrifugationsläufen, HPLC-Auftrennungen (Superose 12 HR 10/30-Säulenmaterial, Firma: Pharmacia) und Proteinfluoreszenzmessungen [Urbanke, persönliche Mitteilung; Vennekohl 1996; Kühn, 1995], in denen das wt-His_6-Fusionsprotein ein gegenüber dem His_6-freien-Wildtypenzym abweichendes Verhalten zeigte, trafen wir die Annahme, daß dieses Verhalten auf einer erhöhten Aggregationsneigung des His_6-Fusionsproteins beruhte. Eine Verbesserung der Bindungskonstante bei Erhöhung des Reaktionsvolumens und konstanter Stoffmenge, bestätigte diese Vermutung. Bei hohen Proteinkonzentrationen wird die Bindungskapazität von *Eco*RI-His_6-Fusionsproteinen bedingt durch ihre Aggregationsneigung ungünstig beeinflußt und ergibt scheinbar zu niedrige Werte.
Da der Gel-Retardations-*Assay* aufgrund der Probentaschengröße einer Volumenbegrenzung unterliegt und mit dieser Methode auch unter für das Wildtypenzym optimierten Bindungseigenschaften für die Mutanten im *Extended Chain*-Motiv keine Bindung gemessen werden

konnte, wurde die Methode der Nitrozellulose-Filterbindung angewendet. Für die Bindung wurde ein 13Bp langes Substrat eingesetzt, um unspezifische DNA-Wechselwirkungen auszuschließen. Mit diesem Substrat konnten im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten Oligonukleotiden die besten Bindungskonstanten ermittelt werden. Für das Wildtypenzym wurde so eine Bindungskonstante von 7,8 x $10^9 M^{-1}$ gemessen werden. Dieser Wert entsprach Konstanten, die bereits in diesem Institut bestimmt wurden [Alves *et al*., 1989a]. Auch hier konnte jedoch für die Mutanten im *Extended Chain*-Motiv keine Bindung nachgewiesen werden.

Da viele der untersuchten Mutanten über eine detektierbare spezifische Aktivität verfügen, die für die Mutante M137Q bei dem zur Bindung eingesetzten Oligonukleotid sogar höher lag, als für das Wildtypenzym, wurde ein Gel-Retardations-*Assay* in Gegenwart zweiwertiger Katinen (Ca^{2+}) durchgeführt. Die Methode der Nitrozellulose-Filterbindung eignet sich hier nicht, da Kalziumionen Wechselwirkungen mit der Membran und der DNA eingehen, was eine drastische Erhöhung der unspezifischen Retention der DNA auf dem Filter bewirkt und eine quantitative Auswertung der Bindung unmöglich macht. Eine Induktion der DNA-Bindung durch Zugabe zweiwertiger Kationen ist bereits für die Restriktionsendonukleasen *Eco*RV [Vipond *et al*., 1995], *Pvu*II [Nastri *et al*., 1997] und *Mun*I [Lagunavicius *et al*., 1997a] sowie für die *Eco*RI-Mutanten K130A und K130E [Windolph & Alves, 1997] gezeigt worden. Analog konnten hier für einige der Mutanten im *Extended Chain*-Motiv von *Eco*RI nach Zugabe von Kalziumionen Bindungskonstanten ermittelt werden. Die in Phosphatpuffer stabilisierten Proteine konnten jedoch aufgrund des niedrigen Löslichkeitsproduktes von $Ca_3(PO_4)_2$ nicht in beliebig hohen Konzentrationen eingesetzt werden.

Das Wildtypenzym zeigt in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} und bei pH 7,5 eine Bindungskonstante von 4,8 x $10^9 M^{-1}$ und damit eine vergleichbare Bindung, wie sie bereits in der Nitrozellulose-Filterbindung bei diesem pH-Wert gemessen wurde. Die Bindung wurde bei pH 7,5 ermittelt, da auch die kinetischen Untersuchungen hauptsächlich bei diesem pH-Wert durchgeführt wurden. Die Mutante M137Q zeigt im Gegensatz zu ihrer unbeeinflußten Spaltaktivität eine um den Faktor 200 gegenüber dem Wildtypenzym verminderte DNA-Bindungsfähigkeit. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Bindungs- und dem Spaltverhalten dieser Mutante könnte ein Unterschied der Konformationen, die diese Mutante unter in Gegenwart von Mg^{2+} und Ca^{2+} einnimmt, sein. Im Vergleich zu den Mutanten K130E und K130A ist dieser Unterschied vergleichsweise hoch. Alle anderen Mutanten zeigen ebenfalls eine gegenüber dem Wildtypenzym verminderte Bindungsfähigkeit (siehe Tabelle 14). Die ermittelten Bindungskonstanten sind aufgrund der gleichzeitig reduzierten Spaltgeschwindigkeiten auf unter-

schiedlichen Substraten, mit Ausnahme des schlechten Bindungsverhalten der Mutante M137Q, kein unerwartetes Ergebnis.

Ein Aminosäureaustausch im *Extended Chain*-Motiv geht nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen mit einer verminderten DNA-Erkennung aufgrund der Beeinträchtigung einer oder mehrer Bindungen einher. Dies hat aber weiterreichende Folgen, als es bisher für andere Mutanten mit veränderten Basenkontakten gefunden wurde: Eine spezifische DNA-Bindung ist nicht mehr ohne zweiwertige Kationen möglich. Das bedeutet, daß Eingriffe in das sehr eng in die große Furche der Erkennungssequenz eingeschmiegte *Extended Chain*-Motiv die Gesamtkonformation des Enzyms destabilisieren. Das Wildtypenzym kann entweder durch eine spezifische Bindung an die DNA oder durch die Bindung von Magnesium in eine katalytisch kompetente Konformation gebracht werden [Alves *et al*., 1989a], die Mutanten benötigen zweiwertige Kationen und die DNA-Bindung gleichzeitig. Dieses in seiner Breite neue Ergebnis erhellt die große Bedeutung der konformationellen Flexibilität des Enzyms und wirft die Frage auf, wo die Kationenbindungsstelle lokalisiert ist. Es war spekuliert worden, daß Asp133 und Asp135 eine solche Kationenbindungsstelle im *Inner Arm* bilden würden [Windolph & Alves, 1997]. Allerdings konnten wir zeigen [Rosati, persönliche Mitteilung], daß beide Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht werden können, ohne daß die Kalziumabhängigkeit der DNA-Bindung für die K130E Mutante verloren ginge. Es ergeben sich also neue Möglichkeiten weiterführende Experimente auf der Suche nach dieser Kationenbindungsstelle.

Der hier vorgestellte Nachweis hydrophober Kontakte für die Sequenzerkennung der *Eco*RI stellt ein wichtiges Ergebnis allgemeinerer Bedeutung dar. Bisher gibt es zwar sehr viele Untersuchungen sowohl mit Basenanaloga als auch mit zielgerichteter Mutagenese, die sich mit Wasserstoffbrückenbindungen in Protein-DNA-Komplexen befassen. Schlüssig nachgewiesen wurden hydrophobe Kontakte erst für den Glucocorticoidrezeptor [Alroy & Freedman, 1992], für den Transkriptionsfaktor GCN4 [Suckow et al.,1993], Gln115 der *Eco*RI [Jeltsch *et al*., 1993] und Asn188 der *Eco*RV [Wenz *et al*., 1994]. In keinem Fall aber konnte ein solch ausgedehntes hydrophobes Cluster aus drei Pyrimidinen und vier Aminosäuren eindeutig gezeigt werden.

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Die Restriktionsendonuklease *Eco*RI bindet bereits in Abwesenheit zweiwertiger Kationen ihre Erkennungssequenz GAATTC spezifisch und spaltet diese in Gegenwart von Mg^{2+} zwischen dem G und dem A. Die spezifische Erkennung des Enzyms wird insbesondere durch Aminosäurereste des *Extended Chain*-Motivs über zahlreiche Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zu den Basen und Phosphaten der DNA vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aminosäurepositionen Met137, Gly140 und Ala142 des *Extended Chain*-Motivs, die aufgrund der Röntgenstrukturanalyse hydrophobe Kontakte zur Erkennungssequenz der DNA ausbilden sollen, mittels zielgerichteter Mutagenese auf ihre Beteiligung an der spezifischen DNA-Erkennung untersucht.

Für die Aminosäureposition Met137 führten Austausche zu Aminosäuren, die keinen hydrophoben Kontakt mehr bilden können, zu einer Abnahme an spezifischer Aktivität in einer Größenordnung, die dem Verlust eines hydrophoben Kontaktes entsprechen könnte. Aminosäurereste, die einen größeren Raumbedarf als das Methionin haben, zeigten eine geringe oder gar keine spezifische Aktivität. Eine Ausnahme stellte die Mutante M137Q dar, die offensichtlich in der Lage ist, einen Kontakt zu einem Thymin anstelle des Cytosins an dessen Position innerhalb der Erkennungssequenz auszubilden. Diese neue Wechselwirkung scheint die ursprünglichen Kontakte von Ala138 und Met137 zum Cytosin der Erkennungssequenz zu kompensieren, da das Enzym deutlich höhere Umsatzgeschwindigkeiten mit entsprechend modifizierten Oligonukleotiden zeigte.

Der postulierte Kontakt von Gly140 zum äußeren Thymin der Erkennungssequenz konnte auch durch zielgerichte Mutageneseuntersuchungen bestätigt werden. Aufgrund der Ergebnisse kinetischer Untersuchungen mit modifizierten Oligonukleotiden konnte für diese Aminosäure ein weiterer Kontakt auch zum inneren Thymin der Erkennungssequenz gefunden werden.

Aminosäureaustausche an der Position Ala142 führten zu einem drastischen Verlust der spezifischen Aktivität. Bei Substitutionen des Alanins durch Glycin oder Serin, zwei Aminosäuren, die sich hinsichtlich ihres Raumbedarfs und biochemischer Eigenschaften nur geringfügig von Alanin unterscheiden, war eine stark eingeschränkte katalytische Aktivität zu beobachten. Alle anderen Austausche führten zu einem vollständigem Verlust der spezifischen Aktivität.

Keine der Mutanten mit einem Aminosäureaustausch im *Extended Chain*-Motiv von *Eco*RI

vermochte in Abwesenheit zweiwertiger Kationen DNA zu binden. In Anwesenheit von Kalzium zeigten nahezu alle untersuchten Einzelmutanten spezifische Bindung, die im Vergleich zum Wildtypenzym jedoch deutlich geringer ausgeprägt war. Diese Ergebnisse sprechen für eine strukturelle Bedeutung zweiwertiger Kationen über ihre Beteiligung an der Katalyse hinaus. Das ist ein wichtiges neues Ergebnis, das durch frühere Experimente allerhöchstens nur angedeutet wurde.

Insgesamt sprechen alle erzielten Ergebnisse eindeutig für einen Beitrag der hydrophoben Kontakte zu den Pyrimidinbasen zur spezifischen DNA-Erkennung der Restriktionsendonuklease *Eco*RI. Die Redundanz der Vielzahl spezifischer Kontakte verhindert jedoch eine Veränderung der Sequenzspezifität des Enzyms durch einzelne Aminosäureaustausche.

Die beschriebenen Einzelmutanten wurden in Kombination mit anderen, bereits beschriebenen Aminosäureaustauschen zur Erweiterung und/oder Änderung der Sequenzspezifität untersucht. Die Mehrfachmutanten waren so konstruiert, daß die kognate Erkennung durch Verlust einer Wechselwirkung geschwächt wurde, in Verbindung dazu ein potentieller neuer Kontakt angeboten wurde und zusätzlich Aminosäureaustausche eingeführt wurden, die in den Einzelmutanten eine erhöhte katalytische Aktivität zeigten. Die Ansätze zur Veränderung oder Erweiterung der Sequenzspezifität durch Mehrfachmutationen führten unter bestimmten Bedingungen zur Spaltung einer einzigen Sequenz auf dem Substrat λ-DNA, das fünf kognate Spaltstellen für *Eco*RI enthält. In den meisten Fällen zeigten die hergestellten Mehrfachmutanten jedoch keine spezifische Aktivität, was vermutlich auf die starke Kopplung zwischen Erkennung und Katalyse zurückzuführen ist. Alle Mehrfachmutanten waren in ihrer Bindung so stark beeinträchtigt, daß mit den hier verwendeten Verfahren keine Bindungskonstante bestimmt werden konnte.

Schlagworte: *Eco*RI, hydrophobe Wechselwirkungen, Spezifitätsänderung

5.2 Abstract

In absence of divalent cations, the restriction endonuclease *Eco*RI binds the specific DNA sequence GAATTC and cleaves it between G and A in the presence of Mg^{2+}. The amino acid residues of the extended chain motif are mainly responsible for the specific interactions between protein and DNA. They form numerous hydrogen bonds, ionic and hydrophobic interactions with bases and phosphates of the DNA.

According to the crystal structure analysis, the amino acid residues Met137, Gly140 and Ala142 are predicted to form hydrophobic contacts with the recognition sequence. In the pre-

sent work, the role of these three residues was investigated using site directed mutagenesis and modified oligonucleotide cleavage studies.

Amino acid substitutions of Met137 by residues which are not able to build hydrophobic interactions lead to a decrease of the specific activity to an extent which corresponds to a hydrophobic interaction. Substitutions by amino acid residues having bulkier side chains than methionine showed little or no specific activity. One exception is M137Q, which has a specific activity compatible to the wild-type enzyme. This mutant cleaves oligodeoxynucleotide substrates with a T/G mismatch base pair faster than the canonical substrate with its C/G basepair A hydrogen bond between glutamine and thymine as well as cytosine seems to compensate for the original contacts by Ala138 and Met137.

The postulated contact of Gly140 to the outer thymine of the recognition sequence could be verified in mutagenesis experiments. Based on the kinetic data of the cleavage experiments with modified oligonucleotides, we postulate an additional second contact also to the inner thymine.

Amino acid substitutions for Alanine at position 142 lead to a strong decrease in activity. Substitutions with glycine or serine, two amino acids that are only slightly smaller or larger than alanine, lead to a similarly reduced specific activity. Every other substitution eleminates catalytic activity.

None of the investigated mutants in the extended chain motif is able to bind DNA in the absence of divalent cations. In the presence of calcium almost all of the single mutants showed specific binding behaviour, which was weaker than wild-type binding. These results support the importance of divalent cations for the induction of a conformational change in the enzyme and are in accordance with previous works with other mutants.

We have shown through site directed mutagenesis and modified oligonucleotide cleavage studies the importance of Met137, Gly140, and Ala142 in making hydrophobic contacts to the pyrimidine bases for specific DNA recognition of the restriction endonuclease *Eco*RI. The redundancy of the multiple specific contacts prevents an alteration of the sequence specificity by substitution of one amino acid residue.

The described single mutants were investigated in combination with other amino acid substitutions which have been already described in previous work in an effort to change or enlarge the recognition sequence specificity. These multiple mutants were constructed in an effort to reduce recognition at the canonical sequence while offering amino acid substitutions that would generate alternative DNA contacts and possibly new sequence specificities. Additional amino acid

substitutions which increased the specific activity were made, because of the strong coupling between recognition and catalysis. Some multiple mutants, under certain buffer conditions, cleaved at one single recognition sequence on substrate λ-DNA, which contains five cleavage sites for *Eco*RI. In most cases the multiple mutants showed no binding and/or catalytic activity. The lack of activity in these mutants is probably due to the strong dependence between recognition and catalysis. The multiple mutants showed no detectable binding to DNA.

Keywords: *Eco*RI, hydrophobic interaction, sequence specificity

6 Literaturverzeichnis

Abarzua, P. and Gubler, M. L. (1995)
Nonradioactive assay for sequence-specific DNA binding proteins
BioTechniques **8**, 1008

Alroy, I. and Freedman, L. P. (1992)
DNA binding analysis of gucocorticoid receptor specificity mutants
Nucl. Acids Res. **20**, 1045

Alves, J., Pingoud, A., Langowski, J., Urbanke, C., and Maass, G. (1982)
Two identical subunits of the *Eco*RI restriction endonuclease co-operate in the binding and cleavage of the palindromic substrate
Eur. J. Biochem. **124**, 139

Alves, J., Urbanke, C., Fliess, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1989)
Stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *Eco*RI res--triction endonuclease
Biochemistry **28**, 7879

Alves, J., Rüter, T., Fliess, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1989a)
Changing the hydrogen bonding potential in the DNA binding site of *Eco*RI 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

Anderson, B. and McDonaldson, G. (1993)
Construction of DNA libraries of AT-rich organisms using *Eco*RI star activity
Anal. Biochem. **211**, 325

Arber, W. and Dussoix, D. (1962)
Host specificity of DNA producted by *Escherichia Coli* : I. Host controlled modification of bacteriophage λ
J. Mol. Biol. **5**, 18

Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P. A., Wilson, K. S., and Kokkinidis, M. (1994)
Crystal structure of *Pvu*II endonuclease reveals extensive structural homologies to *Eco*RV
Nat. Struct. Biol. **1**, 469

Baker, E. N. and Hubbard, R. E. (1984)
Hydrogen bonding in globular proteins
Prog. Biophys. Molec. Biol. **44**, 97

Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R., and Stunnenberg, H.G. (1993)
Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis
Nucleic Acids Res. **22**, 541

Bickle, T. A. (1993)

The ATP-dependent restriction enzymes
in *Nucleases* (Linn, S. M., Lloyd R. S., Roberts, R. J., Eds), 89, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York

Botterman, J. and Zabeau, M. (1985)
High level production of the *Eco*RI endonuclease under the control of the P_L-promotor of bacteriophage λ
Gene **37**, 229

Bozic, D., Grazulis, S., Siksnys, V., and Huber, R. (1996)
Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr*10I at 2.15Å resolution
J. Mol. Biol. **255**, 176

Cheng, X., Balendrian, K., Schildkraut, I., and Anderson, J.E. (1995)
Structure of *Pvu*II endonuclease with cognate DNA
EMBO J. **13**, 3927

Chung, C.T., Niemela, S.L., and 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

Connolly, B.A., Eckstein, F., and Pingoud, A. (1984)
The stereochemical course of the restriction endonuclease *Eco*RI catalyzed reaction
J. Biol. Chem. **259**, 10760

Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Boyer, H.W., and Goodman, H. M. (1974)
Physical identity of the SV40 deoxyribonucleic acid sequence recognized by the *Eco*RI restriction endonuclease and modification methylase.
Biochemistry, **13**, 503

Eggleston, A.K. and West, S.C. (1997)
Easy as A, B, C, D, ... χ?
Curr. Biol. **7,** 45

Ehbrecht, H.-J., Pingoud, A., Urbanke, C., Maass, G., and Gualerzi, C. (1985)
Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA
J. Biol. Chem. **260**, 6160

Engler, L.E., Welch, K.K., and Jen-Jacobson, L. (1997)
Specific binding by *Eco*RV endonuclease to its DNA recognition site GATATC
J. Mol. Biol. **269**, 82

Flores, H., Osuna, J., Heitman, J., and Soberón, X. (1995)
Saturation mutagenesis of His114 od *Eco*RI reveals relaxed-specificity mutants
Gene **157**, 295

Fließ, A., Wolfes, H., Rosenthal, A., Schwellnus, K., Blöcker, H., Frank, R., and Pingoud, A. (1986)

Role of thymidine residues in DNA recognition by the *Eco*RI and *Eco*RV restriction endonuclease
Nucleic Acids Res. **14**, 3463

Fritz, A. (1994)
Protein *Engineering* von Enzymvarianten des *Extended Chain*-Motivs der Restriktionsendonuklease *Eco*RI
Dissertation, Universität Hannover

Gardner, R. C., Howarth, A. J., Messing, J., and Shepherd, R. J. (1982)
Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *Eco*RI*
DNA **1**, 109

Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A., Wolfes, H., Pingoud, V., Urbanke, C., Maass, G., Pingoud, A., Düsterhöft, A., and Kröger, M. (1989)
Genetic engineering of *Eco*RI mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site. Physico-chemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln144Lys145 and Gln144Lys200 mutants
Biochemistry **28**, 2667

Goodman, H.M., Greene, P.J., Garfin, D.E., and Boyer, H.W. (1977)
DNA site recognition by the *Eco*RI restriction endonuclease and modification methylase
in *Nucleic acid - protein recognition* (Vogel, H., J., Ed), 239, Academic Press, New York

Grabowski, G. (1993)
Charakterisierung des aktiven Zentrums der Restriktionsendonuklease *Eco*RI mithilfe zielgerichtet hergestellter Mutanten
Diplomarbeit, Universität Hannover

Grabowski, G., Jeltsch, J., Wolfes, H., Maass, G., and Alves, J. (1995)
Site-directed mutagenesis on the catalytic center of the restriction endonuclease *Eco*RI
Gene **157**, 113

Grabowski, G. (1998)
Untersuchung zum Mechanismus der Katalyse und zu *In vivo* Selektionssystemen für die Anreicherung von Mutanten der Restriktionsendonuklease *Eco*RI mit veränderter Bindungs- oder Spaltspezifität
Dissertation, Universität Hannover

Greene, P.J., Grupta, M., and Boyer, H.W. (1981)
Sequence analysis of the DNA encoding the *Eco*RI restriction endonuclease and methylase
J. Biol. Chem. **256**, 2143

Halford, S.E., Johnson, N.P., and Grinsted, J. (1979)
The reactions of the *Eco*RI and other restriction endonucleases
Biochem. J. **179,** 353

Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. **166,** 557

Hassanain, H.H., Dai, W., and Gupta, S.L. (1993)
Enhanced gel mobility shift assay for DNA-binding factors
Anal. Biochem. **213,** 162

Hedgpeth, J., Goodman, H.M., and Boyer, H.W. (1972)
DNA nucleotide sequence restricted by the *Eco*RI endonuclease
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 3448

Heitman, J. (1992)
How the *Eco*RI Endonuclease recognizes and cleaves DNA
BioEssays **14**, 445

Hochuli, E. (1990)
Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbents
in *Genetic Engineering, Principles and Methods* (Setlow,J.K., Ed) **12**, 87, Plenum Press, New York

Hsu, M. and Berg, P. (1978)
Altering the specificity of restriction endonuclease: Effect of replacing Mg^{2+} with Mn^{2+}
Biochemistry **17**, 131

Jack, W.E., Terry, B.J., and Modrich, P. (1982)
Involvement of outside DNA sequences in the major kinetic path by which *Eco*RI endonuclease locates and leaves its recognition sequence
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4010

Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimasauskas, S., and Butkus, V., (1992)
Purification and properties of the *Eco*57I restriction endonuclease and methylase-prototype of a new class (type IV)
Nucleic Acids Res. **20**, 6043

Janulaitis A., Petrusyte M., Timinskas A., Klimasauskas S., and Butkus V., (1992a)
Cloning and sequence analysis of the gene coding for *Eco*57I type IV restriction-modification enzymes
Nucleic Acids Res. **20**, 6051

Jeltsch, A., Alves, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1992)
On the catalytic mechanism of *Eco*RI and *Eco*RV
FEBS Letters **304**, 4

Jeltsch, A., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1993)
Mutational analysis of the function of Gln115 in the *Eco*RI 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. Biol. Chem. **229**, 221

Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1993a)
Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *Eco*RI and *Eco*RV restriction enzymes

Biochemistry **90**, 8499

Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1994)
Pausing of the restriction endonuclease *Eco*RI during linear diffusion on DNA
Biochemistry **33**, 10215

Jeltsch, A., Alves, J., Urbanke, C., Maass, G., Eckstein, H., Lianshan, Z., Bayer, E., and Pingoud, A. (1994a)
A dodecapeptide comprising the Extended-Chain-α4 region of the restriction endonuclease *Eco*RI specifically binds to the *Eco*RI recognition site
J. Biol. Chem. **270**, 5122

Jeltsch, A., Wenz, C., Stahl, F., and Pingoud, A. (1996)
Linear diffusion of the restriction endonuclease *Eco*RV on DNA is essential for the *in vivo* function of the enzyme
EMBO J. **15**, 5104

Jen-Jacobson, L., Lesser, D., and Kurpiewski, M. (1986)
The enfolding arms of *Eco*RI endonuclease: Role in DNA binding and cleavage
Cell **45**, 619

Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J., and Rosenberg, J.M. (1990)
Refinement of *Eco*RI endonuclease crystal structure: A revised protein chain tracing
Science **249**, 1307

Kim, J.J., Kyung, T.M., Myoung, H.K., Sirk, J.A., Byung, D.K., and Lee, D.S. (1996)
*Eco*RI variant N199H has enhanced specific activity
Gene **171**, 129

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., and Cheng, X. (1994)
HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix
Cell. **76**, 357

Kostrewa, D. and Winkler, F.K. (1995)
Mg^{2+} binding to the active site of *Eco*RV endonuclease: A crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2Å resolution
Biochemistry **34**, 683

Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., and Fritz, H.J. (1984)
The gapped-duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction
Nucleic Acids Res. **12**, 9441

Krüger, D.H., Kupper, D., Meisel, A., Reuter, M., and Schroeder, C. (1995)
The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral DNA genomes
FEMS Microbiol. Rev. **17**, 177

Kühn, C. (1995)
Kinetische Untersuchungen zur *Star*aktivität der Restriktionsedonuklease *Eco*RI
Diplomarbeit, Universität Hannover

Küster, W. (1995)
Zielgerichtete Mutagenese der Restriktionsendonuklease *Eco*RI und Charakterisierung von Mutanten mit Aminosäureaustauschen für Ile197
Diplomarbeit, Universität Hannover

Kurpiewski, M.R., Koziolkiewicz, M., Wilk, A., Stec, W.J., and Jen-Jacobson, L. (1996)
Chiral phosphorothioates as probes of protein interactions with individual DNA phosphoryl oxygens: Essential interactions of *Eco*RI endonuclease with the phosphate at pGAATTC
Biochemistry **35**, 8846

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227,** 680

Lagunavicius, A. and Siksnys, V. (1997)
Site-directed mutagenesis of putative active site residues of *Mun*I restriction endonuclease: Replacement of catalytically essential carboxylate residues triggers DNA binding specificity
Biochemistry **36**, 11086

Lagunavicius, A., Grazulis, S., Balciunaite, E., Vainius, D., and Siksnys,V. (1997a)
DNA binding specificity of MunI restriction endonuclease is controlled by pH and calcium ions: Involvement of active site carboxylate residues
Biochemistry **36**, 11093

Lane, A.N., Jenkins, T.C., Brown, T., and Neidle, S. (1991)
Interaction of berenil with the *Eco*RI dodecamer d(CGCGAATTCGCG)$_2$ in solution studied by NMR
Biochemistry **30**, 1372

Langowski, J., Urbanke, C., Pingoud, A., and Maass, G. (1981)
Transient cleavage kinetics of the *Eco*RI restriction endonuclease measured in a pulsed quench-flow apparatus: Enzyme concentration-dependent activity change
Nucleic Acids Res. **9**, 3483

Lesser, D. R., Kurpiewski, M. R., and Jen-Jacobson, L. (1990)
The energetic basis of specificity in the *Eco*RI endonuclease-DNA interaction
Science **250**, 776

Lesser, D.R., Grajkowski, A., Kurpiewski, M.R., Koziolkiewicz, M., Stec, W.J., and Jen-Jacobson, L. (1992)
Stereoselective interaction with chiral phosphorothioates at the central DNA kink of the *Eco*RI endonuclease-GAATTC complex
J. Biol. Chem. **267**, 24810

Luria, S.E. and Human, M.L. (1952)
A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses
J. Bacteriol. **64**, 557

Malyguine, E., Vannier, P., and Yot, P. (1980)
Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents
Gene **8**, 163

McClarin, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J., and Rosenberg, J.M. (1986)
Structure of the DNA-*Eco*RI endonuclease recognition complex at 3Å resolution
Science **234**, 1526

Modrich, P. and Zabel, D. (1976)
*Eco*RI endonuclease physical and catalytic properties of the homogenous enzyme
J. Biol. Chem. **256**, 5866

Mullis, K. and Falcona, F. (1987)
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction
Methods Enzymology **155**, 335

Nastri, H.G., Evans, P.D., Walker, I.H., and Riggs, P.D. (1997)
Catalytic and DNA binding properties of *Pvu*II restriction endonuclease mutants
J. Biol. Chem. **272,** 25761

Newman, A.K., Rubin, R.A., Kim, S.H., and Modrich, P. (1981)
DNA sequences of structural genes for *Eco*RI DNA restriction and modification enzymes
J. Biol. Chem. **256**, 2131

Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K. (1994)
Structure of *Bam*HI endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding
Science **269**, 656

Oelgeschläger, T. (1992)
Protein-Engineering an der restriktionsendonuklease *Eco*RI: Konstruktion von Enzymvarianten mit erweiterer Substratspezifität
Dissertation, Universität Hannover

Peters, F. and Greipel, J. (1993)
„Computerprogramm Circular“
Handbuch der Biophysikalischen Meßgeräteabteilung, MH-Hannover

Pingoud, A. (1985)
Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases
Eur. J. Biochem. **147**, 105

Pingoud, A. and Jeltsch, A. (1997)
Recognition and cleavage of DNA by type II restriction endonucleases
Eur. J. Biochem. **246**, 1

Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., and Boyer, H.W. (1975)
Specificity of substrate recognition by the *Eco*RI restriction endonuclease
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3310

Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., and Brammar, W.J. (1989)
Cloning Vectors: A Laboratory Manual
Elsevier Science Ltd, Amsterdam

QIA*expressionist* (1997)
A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins
Handbuch der Firma Qiagen

Rosenberg, J.M. and Greene, P. (1982)
*Eco*RI* specificity and hydrogen bonding
DNA **1**, 117

Rosenberg, J.M. (1991)
Structure and function of restriction endonucleases
Curr. Op. Struct. Biol. **1**, 104

Roberts, R.J. and Macelis D. (1997)
REBASE restriction enzymes and methylases
Nucleic Acids Res. **25**, 248

Rubin, R.A. and Modrich, P. (1978)
Substrate dependence of the mechanism of *Eco*RI endonuclease
Nucleic Acids Res. **5**, 2991

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463

Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F., and Pingoud, A. (1992)
A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *Eco*RV
Biochemistry **31**, 4808

Siksnys, V., Zareckaja, N., Vaisvila, R., Timinskas, P., Butkus, V., and Janulaitis, A. (1994)
CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: Sequence similarties between R·*Mun*I and R·*Eco*RI
Gene **142**, 1

Sturrock, S.S. and Dryden, T.F. (1997)
A prediction of the amino acids and structures involved in DNA recognition by type I DNA restriction and modification enzymes

Nucleic Acids Res. **25**, 3408

Suckow, M., von Wilcken-Bergmann, B. and Müller-Hill, B. (1993)
The DNA binding specificity of the basic region of the yeast transcriptional activator GCN4 can be changed by substitution of a single amino acid
Nucleic Acids Res. **21**, 2081

Taylor, J.D. and Halford, S.E. (1992)
The activity of the *Eco*RV restriction endonuclease is influenced by flanking DNA sequences both inside and outside the DNA-protein-complex
Biochemistry **31**, 90

Terry, B.J., Jack, W.E., Rubin, R.A., and Modrich, P. (1983)
Thermodynamic parameters governing interaction of *Eco*RI endonuclease with specific and nonspecific DNA sequences
J. Biol. Chem. **258**, 9820

Thielking, V., Alves, J., Fliess, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1990)
Accuracy of the *Eco*RI restriction endonuclease: Binding and cleavage studies with oligo-deoxynucleotide substrates containing degenerate recognition sequences
Biochemistry **29**, 6416

Thielking, V., Selent, U., Köhler, E., Landgraf, A., Alves, J., and Pingoud, A. (1992)
Mg^{2+} confers DNA binding specifity to the *Eco*RI restriction endonuclease
Biochemistry **31**, 3727

Vennekohl, P. (1996)
Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Stabilisierung der dimeren Restriktions-endonuklease *Eco*RI
Diplomarbeit, Universität Hannover

Vieira, J. and Messing, J. (1982)
The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers
Gene **19**, 259

Vipond, I.B. and Halford, S.E. (1995)
Specific DNA recognition by *Eco*RV restriction endonuclease induced by calcium ions
Biochemistry **34**, 1113

Wah, D., Hirsch, J. A., Dorner, L. F., Schildkraut, I., and Aggarwal, A. K. (1997)
Structure of the multimodular endonuclease *Fok*I bound to DNA
Nature **388,** 97

Waugh D.S. and Sauer, R.T. (1993)
A novel class of *Fok*I restriction endonuclease mutants that cleave hemi-methylated substrates
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 9596

Wenz, C., Selent, U., Wende, W., Jeltsch, A., Wolfes, H. and Pingoud, A. (1994)

Protein engineering opf the restriction endonuclease *Eco*RV: replacement of an aminoacid residue in the DNA binding site leads to an altered selectivity towards unmodified and modified substrates
Biochim. Biophys. Acta **1219**, 73

Wenz, C., Stahl, F., and Pingoud, A. (1996)
The production and characterization of artificial heterodimers of the restriction endonuclease *Eco*RV
Biol. Chem. Hoppe Seyler **377**, 625

Windolph, S. (1996)
Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphatkontakte für Spezifität und katalytische Aktivität der Restriktionsendonuklease EcoRI
Dissertation, Universität Hannover

Windolph, S., Fritz, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., and Alves, J. (1997a)
Sequence context influencing cleavage activity of the K130E mutant of the restriction endonuclease *Eco*RI identified by a site selection assay
Biochemistry **36**, 9478

Windolph, S, and Alves, J. (1997)
Influence of divalent cations on inner-arm mutants of restriction endonuclease *Eco*RI
Eur. J. Biochem. **244**, 134

Winkler, F.K., Banner, D.W., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R.S., Heathman, S.P., Bryan, R.K., Martin, P.D., Petratos, K., and Wilson, K.S. (1993)
The crystal structure of *Eco*RV endonuclease and its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments
EMBO J. **12**, 1781

Wittmeyer, P.K., McKenzie, J.L., and Raines, R.T. (1998)
Degenerate DNA recognition by I-*Ppo*I endonuclease
Gene **206**, 11

Wolfes, H., Alves, J., Fliess, A., Geiger, R., and Pingoud, A. (1986)
Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 und Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *Eco*RI
Nucleic Acid Res. **14**, 9063

Woodbury, C.P.J., Hagenbüchle, O., and von Hippel, P.H. (1980)
DNA site recognition and reduced specificity of the *Eco*RI Endonuclease
J. Biol. Chem. **255**, 11534

Woodhead, J.L., Bhave, N., and Malcolm, A.D.B. (1981)
Cation dependence of restriction endonuclease *Eco*RI-activity
Eur. J. Biochem. **115**, 293

Zabeau, M. and Stanley, K.K. (1982)

Enhanced expression of cro-B-galactosidase fusion protein under control of the promotor of bacteriophage λ
EMBO J. **1**, 1217

Zell, R. and Fritz, H.J. (1987)
DNA mismatch repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5'-methyl cytosine residues
EMBO J. **6**, 1807

Lebenslauf

Name:	Wolfgang Küster
Anschrift:	Lakefeldstraße 2
	30926 Seelze
Geburtsdatum:	04.11.1966 in Langenhagen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
1973-1977	Grundschule Seelze-Letter
1977-1979	Orientierungsstufe Seelze-Letter
1979-1986	Gymnasium Seelze-Letter mit Abschluß Abitur
1986-1987	Ableistung des Wehrdienstes
1987-1989	Ausbildung zum biologisch-technischen-Assistenten
1989-1995	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
09.01.1995	Beendigung des Studiums der Biochemie mit der Abgabe der Diplomarbeit
seit 01.03.1995	Beginn der Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover im Institut für Biophysikalische Chemie
zusätzliche Kenntnisse:	Bescheinigte Teilnahme an der Fortbildungsveranstaltung Gentechnische Sicherheit nach §15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV
	Bescheinigte Teilnahme an einer Lehrveranstaltung zur Erlangung der Fachkunde zum Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen. Gemäß §6 StrschV für die Fachkundegruppe 4.2.
	Bescheinigte Teilnahme an Vorlesung und Übungen über spektroskopische Methoden
außerberufliche Aktivitäten:	Übungsleiter einer Sportmannschaft
	Sportaktivitäten unterschiedlicher Art
	moderne Literatur
	Theaterbesuche

Hannover, den 08.05.1998

Wolfgang Küster

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.

Seelze, den 08. Mai 1998