

**Untersuchungen zum Mechanismus  
der Katalyse und zu *In vivo*-  
Selektionssystemen für die Anreicherung  
von Mutanten der Restriktionsendo-  
nuklease *EcoRI* mit veränderter DNA-  
Bindungs- oder Spaltspezifität**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Gabriele Grabowski

geboren am 02.04.62 in Steinwedel

Hannover 1998

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biophysikalische Chemie (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Jürgen Alves) an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.02.94 bis zum 21.01.98 unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Alves angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves  
Institut für Biophysikalische Chemie, OE 4350  
an der Medizinischen Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Str. 1  
D-30625 Hannover

Koreferent: Priv. Doz. Dr. Hubert Thole  
Kinderklinik  
Abteilung II Kinderheilkunde und pädiatrische Nieren- und  
Stoffwechselerkrankungen, OE 6724  
an der Medizinischen Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Str. 1  
D-30625 Hannover

Tag der Promotion: 28.04.98

**Meinen Eltern gewidmet**

**Vielen Dank für Alles!**

*“GEWINN SOLL NICHT UNSEREN REICHTUM BEGRÜNDEN, ER WÜRDEN IHN VON INNEN HER ZERSTÖREN. ERKENNE IN JEDEM WESEN UND IN JEDEM DING DAS, WAS SEINEN RUHM AUSMACHT, DAS HEIßT SEINE BESCHAFFENHEIT, SEINEN WERT, SEINE AUSSTRAHLUNG UND SEINEN GEIST. SUCHE WAS SICH NICHT ERSETZEN LÄßT.“*

PHARAO SETHOS IN “RAMSES“ VON CHRISTIAN JACQ

# I. Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen

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

**Grabowski, G.** and Alves, J. (1996)  
Asp59 is not important for the catalytic activity of the restriction endonuclease *EcoRI*  
*FEBS Letters* **381**: 106

# II. Poster- und Tagungsbeiträge

J. Alves, A. Fritz, **G. Grabowski**, A. Jeltsch, A. Pingoud, and S. Windolph <sup>1</sup> (1994)  
The catalytic centre of the restriction endonuclease *EcoRI* and its activation studied by site specific mutations  
3. NEB Workshop on Biological DNA Modification, Vilnius

**G. Grabowski** and J. Alves <sup>1</sup> (1995)  
Transformation of the *EcoRI* restriction endonuclease to an enzyme with altered specificity: Development of a positive *in vivo* selection system  
Herbsttagung der GBCh, Hannover

J. Alves, **G. Grabowski**, W. Küster, P. Vennekohl, and S. Windolph <sup>2</sup> (1995)  
Mechanism of DNA recognition and cleavage by restriction enzymes  
15. GDCh-Konferenz, Giessen

J. Alves, **G. Grabowski**, R. Frank, and P. Vennekohl <sup>1</sup> (1996)  
Changing the specificity of the restriction endonuclease *EcoRI*  
Herbsttagung der GBCh, Leipzig

**G. Grabowski**, S. Windolph, and J. Alves <sup>1</sup> (1996)  
DNA binding and cleavage by the *EcoRI* restriction endonuclease  
FASEB Summer Research Conference, Saxtons River, Vermont

J. Alves, **G. Grabowski**, W. Küster, and P. Vennekohl <sup>1</sup> (1997)  
Towards the change in sequence specificity of the restriction endonuclease *EcoRI*  
Herbsttagung der GBM, Tübingen

J. Alves and **G. Grabowski** <sup>1</sup> (1997)  
Positive selection of mutants of restriction enzymes with changes in sequence specificity  
4. NEB Workshop on Biological DNA Modification, Igls, Tirol

J. Alves, **G. Grabowski**, W. Küster, O. Rosati, and P. Vennekohl <sup>2</sup> (1997)  
Towards the change in sequence specificity of the restriction endonuclease *EcoRI*  
4. NEB Workshop on Biological DNA Modification, Igls, Tirol

<sup>1</sup> Posterbeitrag, <sup>2</sup> Vortrag

Der präsentierende Autor ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

### III. Danksagungen

Mein Dank gilt

- in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft sowie unzählige Ideen waren und sind »ein Quell steter „Freude“«.
- Herrn Priv. Doz. Dr. Hubert Thole für die Übernahme des Koreferates.
- meiner Kollegin und Mitdotorandin Frau Petra Vennekohl, für deren vorbildliche Hilfsbereitschaft als luchsäugiger „*Editor in Chief*“ ein einfacher Dank an dieser Stelle eigentlich nicht genügt.
- Herrn Dr. Heiner Wolfes, sowohl für seine Gesprächs- und Hilfsbereitschaft also auch für die Synthese zahlreicher Oligonukleotide, deren umgehende Lieferung ich Frau Claudia Thiel zu verdanken habe.
- meinem Mitdotoranden Herrn Wolfgang Küster, der mich durch seine Hilfsbereitschaft tatkräftig unterstützt hat.
- den Herren Dr. Andreas Ebnet und Dr. Andreas Fritz, die durch grundlegende Ideen entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herrn Rolf Mull-Grotefend für ungezählte Proteinaufreinigungen, Kinetiken *et cetera* sowie die Übernahme der Photoarbeiten.
- Herrn Dr. Albert Jeltsch, der mir einige Graphiken zur Verfügung stellte.
- Frau Dr. Ursel Selent und Herrn Dr. Virginis Siksnys für die Unterstützung meiner Arbeit, indem sie mir großzügig einige Plasmide überließen.
- Herrn Jürgen Bullmann, der mir nicht nur *software*-technisch geholfen hat.....
- weiterhin allen Mitgliedern der Abteilungen Biophysikalische Chemie und Biochemisch-Biophysikalische Verfahren, die an dieser Stelle nicht namentlich genannt wurden. Sie haben durch ihr Interesse und ihre Hilfsbereitschaft nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt allerdings meinen Eltern, ohne deren Hilfe vieles nicht möglich gewesen wäre.

## IV. Abkürzungsverzeichnis

AA.....	Acrylamid
Ac .....	Acetat
ad.....	auffüllen auf
AdoMet .....	S-Adenosyl-Methionin
Amp.....	Ampicillin
APS .....	Ammoniumperoxodisulfat
ATP .....	Adenosin-5'-triphosphat
Bis .....	N,N'-Methylen-bisacrylamid
bp.....	Basenpaar(e)
BSA .....	Bovines Serumalbumin
c .....	Konzentration
CD .....	Circulardichroismus
cfu.....	<i>Colony forming unit</i>
Chl .....	Chloramphenicol
CTP.....	Cytidin-5'-triphosphat
d .....	desoxy
DC .....	Dünnschichtchromatographie
dd.....	didesoxy
ddH <sub>2</sub> O.....	bidestilliertes Wasser
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP .....	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds .....	doppelsträngig
DTE.....	1,4-Dithioerythriol
DTT .....	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
$\epsilon_{\text{xxxnm}}$ .....	Extinktionskoeffizient bei xxxnm
EtBr .....	Ethidiumbromid
g .....	Erdgeschleunigung
GTP.....	Guanosin-5'-triphosphat
IPTG.....	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid
Kan.....	Kanamycin
LB .....	Luria Bertani
M .....	molar
Me <sup>2+</sup> .....	divalentes Kation
MOPS .....	3-Morpholinopropansulfonsäure
n.b.....	nicht bestimmbar
NTA .....	Nitrilotriessigsäure
NTP.....	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD <sub>xxxnm</sub> .....	Optische Dichte bei xxxnm
Oligonukleotid.....	oligomeres Desoxyribonukleotid
p .....	Plasmid
PAA.....	Polyacrylamid
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDL.....	Phosphat-DTT-Lubrol-Puffer
PEG .....	Polyethylenglycol
pfu.....	<i>Plaque forming unit</i>
P <sub>i</sub> .....	anorganisches Phosphat
PNK .....	Polynukleotidkinase
r .....	ribo
RNA .....	Ribonukleinsäure
rpm .....	Umdrehungen pro Minute



RT.....	Raumtemperatur
S.....	<i>Storage buffer for <math>\lambda</math>-phages</i>
SDS.....	Natriumdodecylphosphat
SM.....	<i>Medium for storage and dilution of <math>\lambda</math>-phages</i>
ss.....	einzelsträngig
ST.....	<i>Saline tris buffer</i>
Std.....	Standard
T.....	Temperatur
TB.....	<i>Medium for transfection of bacterial cells</i>
TBS.....	<i>Tris buffered saline</i>
TCA.....	Trichloressigsäure
TE.....	Tris-EDTA-Puffer
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet.....	Tetracyclin
TFB.....	<i>Transformation buffer</i>
TPE.....	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTE.....	Tris-Taurin-EDTA-Puffer
TTP.....	Thymidin-5'-triphosphat
U.....	Unit (Einheit)
UV.....	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichtes
VIS.....	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichtes
% (v/v).....	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v).....	Gewichtsprozent pro Volumen
wt.....	Wildtyp
X-Gal.....	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins.

Mutanten werden benannt, indem an die auszutauschende Aminosäure mit anschließender Positionsnummer das Kürzel der eingeführten Aminosäure angehängt wird. P90A bezeichnet die Mutante der Position 90, bei der das Prolin gegen Alanin ausgetauscht wurde.

## V. Inhaltsverzeichnis

<b>1.0 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Restriktionsendonukleasen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Vergleich von <i>EcoRI</i> mit anderen Typ II-Restriktionsendonukleasen bekannter   Struktur .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Spezifische DNA-Bindung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Katalysemechanismen der DNA-Spaltung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Sequenzhomologien zwischen <i>EcoRI</i> und <i>MunI</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.8 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>1.8.1 Untersuchungen zum Mechanismus der durch <i>EcoRI</i> katalysierten Spaltung     von DNA.....</b>	<b>16</b>
1.8.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von <i>EcoRI</i> .....	17
1.8.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von <i>EcoRI</i> .....	17
<b>1.8.2 Entwicklung von positiven <i>In vivo</i>-Selektionssystemen zur Anreicherung modifi-     zierter <i>EcoRI</i>-Proteine.....</b>	<b>18</b>
1.8.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA- Spaltspezifität.....	18
1.8.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA- Bindungsspezifität.....	19
<b>2.0 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Enzyme .....	20
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Nährmedien.....	20
2.2.2 Bakterielle Vorkulturen.....	21
2.2.2.1 Vorkulturen für die Infektion mit $\lambda$ -Phagen .....	21
2.2.2.2 Vorkulturen für die Infektion mit filamentösen Phagen.....	22
2.2.3 Bakterienstämme.....	22
2.2.4 Aufbewahrung bakterieller Kulturen.....	26
2.2.5 Kompetente Zellen.....	27
2.2.5.1 TSS-Methode .....	27
2.2.5.2 Rubidiumchlorid-Methode.....	27
2.2.6 Vektoren .....	28
2.2.6.1 Plasmide.....	28
2.2.6.2 Bakteriophagen.....	31
2.2.6.2.1 $\lambda$ -Phagen.....	31
2.2.6.2.2 Filamentöse Phagen.....	32
2.2.7 <i>In vitro</i> -Verpackung rekombinanter $\lambda$ -Phagen .....	33
2.2.8 Übertragung von Vektoren in Bakterienzellen und Plasmidkurierung.....	34
2.2.8.1 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmiden .....	34
2.2.8.2 Erzeugung $\lambda$ -lysogener Bakterienzellen.....	35
2.2.8.3 Plasmidkurierung von Bakterienzellen .....	35

<b>2.2.9 Voruntersuchung rekombinanter <math>\lambda</math>-Phagen</b> .....	36
2.2.9.1 Transfektion von Bakterienzellen und Bestimmung des Phagentiters .....	36
2.2.9.2 <i>Phageplaque-Lifting</i> .....	36
<b>2.2.10 Präparation von Bakteriophagen</b> .....	37
2.2.10.1 Plattenlysate .....	37
2.2.10.2 Flüssigkulturlysate .....	38
2.2.10.3 Gewinnung von Phagen aus einzelnen Plaques (Phageeinzeleulate) .....	38
<b>2.2.11 Charakterisierung rekombinanter <math>\lambda</math>-Phagen</b> .....	39
2.2.11.1 Überprüfung der Phagentoxizität .....	39
2.2.11.2 Abwehr von $\lambda$ -Phagen durch Bakterienzellen .....	39
2.2.11.3 Selektionstestsystem .....	40
<b>2.2.12 Proteinexpression</b> .....	41
2.2.12.1 Expression von <i>EcoRI</i> -Mutanten in kleinem Maßstab (Induktionsversuch) .....	41
2.2.12.2 Expression von <i>EcoRI</i> -Mutanten im 100ml- bis 500ml-Maßstab .....	42
2.2.12.3 Expression von <i>EcoRI</i> -Mutanten im 10l-Maßstab .....	42
2.2.12.4 Expression von <i>EcoRV</i> .....	43
2.2.12.5 Expression von <i>EcoRI</i> durch $\lambda$ -lysogene Zellen .....	44
2.2.12.6 Expression von <i>EcoRI</i> durch Bakterienzellen, die gleichzeitig das <i>lacZ</i> ( $\alpha$ )-System enthalten .....	44
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b> .....	45
<b>2.3.1 Gewinnung von DNA</b> .....	45
2.3.1.1 Gewinnung doppelsträngiger Plasmid-DNA .....	45
2.3.1.2 Gewinnung einzelsträngiger Plasmid-DNA .....	46
2.3.1.3 Gewinnung von $\lambda$ -DNA .....	46
2.3.1.4 Synthetische Oligonukleotide .....	46
<b>2.3.2 DNA-Analytik</b> .....	47
2.3.2.1 Agarosegel-Elektrophorese .....	47
2.3.2.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	48
2.3.2.2.1 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	48
2.3.2.2.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese ( <i>Shadow Casting-Gel</i> ) .....	49
2.3.2.3 UV/VIS-Spektroskopie .....	49
<b>2.3.3 Enzymatische DNA-Modifikationen</b> .....	50
2.3.3.1 Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide .....	50
2.3.3.2 Restriktionsspaltung .....	50
2.3.3.3 <i>Fill in</i> -Reaktionen .....	51
2.3.3.3.1 <i>Fill in</i> -Reaktionen zur Erzeugung von <i>Blunt end</i> -DNA-Fragmenten .....	51
2.3.3.3.2 Hybridisierung und <i>Fill in</i> -Reaktionen für Mutagenesen .....	51
2.3.3.4 Ligation von DNA .....	52
<b>2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten</b> .....	53
2.3.4.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	53
2.3.4.2 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen .....	53
2.3.4.3 Isolierung von DNA aus wässrigen Lösungen .....	53
<b>2.3.5 Erzeugung rekombinanter <math>\lambda</math>-Phagen</b> .....	53
<b>2.3.6 Mutagenese-Strategien</b> .....	54
2.3.6.1 Zielgerichtete Mutagenese .....	54
2.3.6.1.1 <i>Gapped duplex</i> -Mutagenese .....	54
2.3.6.1.2 <i>Closing oligo</i> -Mutagenese .....	58
2.3.6.1.3 <i>Quik change</i> -Mutagenese .....	59
2.3.6.2 Kassetten-Mutagenese .....	60
<b>2.3.7 Thermostabile DNA-Polymerasen und ihre Verwendung</b> .....	62
2.3.7.1 Thermostabile DNA-Polymerasen .....	62
2.3.7.1.1 <i>Taq</i> -Polymerase .....	62
2.3.7.1.2 <i>Pfu</i> -Polymerase .....	62
2.3.7.2 Amplifikation des <i>ecoRI</i> -Gens .....	63
2.3.7.3 Nachweis rekombinanter Phagen .....	64
2.3.7.4 Analyse der Orientierung des <i>ecoRI</i> -Gens in rekombinanten Phagen .....	65
2.3.7.5 Nachweis $\lambda$ -lysogener Bakterienzellen .....	66
2.3.7.6 PCR-Fragmente für Spaltexperimente .....	67

2.3.8 DNA-Sequenzierung.....	68
2.3.8.1 Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger.....	68
2.3.8.2 <i>Taq cycle</i> -Sequenzierung .....	69
<b>2.4 Proteinisolierung .....</b>	<b>71</b>
2.4.1 Zellaufschluß durch Ultraschall.....	72
2.4.2 Säulenchromatographische Aufreinigung.....	72
2.4.2.1 Affinitätschromatographie.....	72
2.4.2.1.1 Aufreinigung von <i>EcoRI</i> aus dem 100ml- bis 500ml-Maßstab.....	72
2.4.2.1.2 Aufreinigung von <i>EcoRI</i> aus dem 10l-Maßstab.....	73
2.4.2.2 Ionenaustauschchromatographie .....	73
2.4.3 Dialyse .....	74
<b>2.5 Proteinanalytik.....</b>	<b>74</b>
2.5.1 UV/VIS-Spektroskopie.....	74
2.5.2 Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli ....	74
2.5.3 Immunoblot .....	76
2.5.4 Circular dichroismus.....	77
<b>2.6 Proteincharakterisierung .....</b>	<b>78</b>
2.6.1 Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität von <i>EcoRI</i> -Mutanten.....	78
2.6.1.1 Bestimmung der Spaltaktivität aus Enzympräparationen und Eluatn der Aufreinigung .....	78
2.6.1.2 Bestimmung der Spaltaktivität aus Rohaufschlüssen.....	79
2.6.2 Untersuchung des DNA-Bindungsverhaltens ( <i>Nitrozellulosefilter-Bindung</i> ).....	79
<b>3.0 Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1 Untersuchungen zum Mechanismus der durch <i>EcoRI</i> katalysierten Spaltung von DNA.....</b>	<b>81</b>
3.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von <i>EcoRI</i> .....	81
3.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von <i>EcoRI</i> .....	87
<b>3.2 Entwicklung von positiven <i>In vivo</i>-Selektionssystemen zur Anreicherung mo- difizierter <i>EcoRI</i>-Proteine.....</b>	<b>94</b>
3.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA- Spaltspezifität.....	94
3.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA- Bindungsspezifität.....	106
<b>4.0 Diskussion.....</b>	<b>117</b>
<b>4.1 Untersuchungen zum Mechanismus der durch <i>EcoRI</i> katalysierten Spaltung von DNA.....</b>	<b>117</b>
4.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von <i>EcoRI</i> .....	117
4.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von <i>EcoRI</i> .....	122
<b>4.2 Entwicklung von positiven <i>In vivo</i>-Selektionssystemen zur Anreicherung mo- difizierter <i>EcoRI</i>-Proteine.....</b>	<b>128</b>

---

4.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA-Spaltspezifität.....	128
4.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von <i>EcoRI</i> -Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität.....	133
5.0 Zusammenfassung .....	138
5.1 Zusammenfassung .....	138
5.2 Abstract .....	139
6.0 Literaturverzeichnis .....	142
7.0 Anhang.....	157



# 1.0 Einleitung

## 1.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Teile sogenannter Restriktions/Modifikationssysteme (R/M-Systeme), die in Prokaryonten ubiquitär vorkommen [Wilson & Murray, 1991]. Sie stellen Enzymsysteme dar, die von Bakterien zur Abwehr eindringender Fremd-DNA, wie sie zum Beispiel durch Bakteriophageninfektion in die Zelle gelangen kann, entwickelt wurden und die Funktion primitiver Immunsysteme übernehmen. Durch verschiedene Autoren wurde bereits im Jahre 1953 die Beobachtung beschrieben, daß Bakteriophagen in verschiedenen Stämmen von *Escherichia coli* (*E.coli*) eine Umwandlung ihres Genoms erfahren [Luria & Human, 1953; Bertani & Weigle, 1953], wobei die Bakteriophagen-DNA, sofern diese die entsprechende Erkennungssequenz enthält, sehr spezifisch durch eine Endonuklease gespalten wird. Die infizierten Zellen verhalten sich restringierend gegenüber der Fremd-DNA, das entsprechende Enzym wird daher als Restriktionsendonuklease bezeichnet.

Der Schutz der zelleigenen DNA wird durch eine spezifische Methylierung im Bereich der Erkennungssequenz, die ein korrespondierendes Modifikationsenzym einführt, erreicht. Die Methylierung der DNA erfolgt in Gegenwart von *S*-Adenosyl-Methionin (AdoMet) entweder an einem Ringkohlenstoffatom (*C*5-Methylcytosin) oder einem exozyklischen Stickstoffatom (*N*4-Methylcytosin oder *N*6-Methyladenin), wodurch sich zwei unterschiedliche Typen von Methyltransferasen ergeben [Cheng, 1995a; Cheng, 1995b].

R/M-Systeme können in verschiedene Klassen unterteilt werden (Tab. 1.1), die sich sowohl bezüglich der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten als auch der durch sie verwendeten Kofaktoren unterscheiden [Bickle & Krüger, 1993; Heitman, 1993; Pingoud & Jeltsch, 1997]. Weitere Unterschiede ergeben sich aus der Erkennung der spezifischen Sequenz und der anschließenden Spaltung der DNA. Alle Systeme benötigen divalente Kationen ( $Mg^{2+}$ ) für ihre katalytische Aktivität.

R/M-Systeme vom Typ I bestehen aus 3 verschiedenen Untereinheiten (R für Restriktion, M für Methylierung, S für Spezifität), die Restriktions- und Modifikationsaktivität in einem Komplex vereinen. Sie bilden gewöhnlich Pentamere der Zusammensetzung  $R_2M_2S$  [Sturrock & Dryden, 1997]. Die S-Untereinheit weist eine zweigeteilte Erkennungsspezifität auf. Die Spaltung der DNA erfolgt in großem Abstand zur Erkennungssequenz in Gegenwart von AdoMet und ATP, das während der Reaktion hydrolysiert wird.

Typ II-Systeme bestehen hingegen aus separaten, voneinander unabhängigen Enzymen. Die monomeren Methylasen benötigen dabei für ihre Aktivität lediglich AdoMet. Die funktionelle Einheit der Restriktionsenzyme stellt typischerweise ein Homodimer dar, das DNA in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen spezifisch zu spalten vermag. Die Erkennungssequenz ist typischerweise 4 bis 8bp lang und palindrom. Die Spaltung erfolgt innerhalb dieser Sequenz oder in ihrer unmittelbaren Nähe. Bei einer Spaltung innerhalb der Achse der Punktsymmetrie des Palindroms ent-

stehen „glatte“ DNA-Enden (*Blunt ends*), während 3'- oder 5'-überhängende Enden (*Sticky ends*) erzeugt werden, wenn das Enzym bezüglich der punktsymmetrischen Achse versetzt spaltet.

Für einige Enzyme, die ursprünglich dem Typ II zugeordnet wurden, zeigte sich, daß diese über ungewöhnliche Eigenschaften verfügen, was zur Schaffung von Typ II-Unterklassen führte. Restriktionsenzyme des Typs IIe werden durch die Bindung einer zweiten Erkennungssequenz, die als Effektor wirkt, allosterisch aktiviert [Krüger *et al.*, 1995]. Die Spaltung erfolgt innerhalb ihrer palindromen Erkennungssequenz. Eine weitere Gruppe stellen Typ IIS-Enzyme dar, bei denen die Endonukleasen als monomere Proteine vorliegen, die mit zwei Domänen ausgestattet sind. Sie erkennen asymmetrische DNA-Sequenzen, in deren Nachbarschaft in definiertem Abstand die Spaltung erfolgt [Szybalski *et al.*, 1991].

Typ III-Systeme bestehen aus je einer Unterheit für das Restriktionsenzym und die Methylase. Während die Methyltransferase allein in Gegenwart von AdoMet katalytisch aktiv ist, erfordert die Restriktion eine Kooperation beider Untereinheiten und ATP [Meisel *et al.*, 1995]. Die Spaltung erfolgt in definiertem Abstand (etwa 25bp) in 3'-Richtung zur asymmetrischen Erkennungssequenz [Bickle, 1993].

Zusätzlich zu den genannten Typen sind in letzter Zeit R/M-Systeme beschrieben worden, deren DNA-Spaltung zwar durch AdoMet stimuliert wird, aber gleichzeitig von ATP unabhängig ist wie bei den Typ III-Enzymen. Sie wurden daher in eine neue Gruppe (Typ IV-Systeme) eingeordnet [Janulaitis *et al.*, 1992a; Janulaitis *et al.*, 1992b]. Ein unter den Restriktionsenzymen ungewöhnliches Verhalten zeigen Proteine vom *BcgI*-Typ. Diese erkennen unterbrochene Sequenzen und die Spaltung erfolgt in definiertem Abstand auf beiden Seiten dieser Sequenz, so daß ein kurzes Stück aus der DNA herausgetrennt wird.

Tab.1.1: Vergleich der verschiedenen Restriktionsendonuklease-Typen nach Pingoud & Jeltsch (1997)

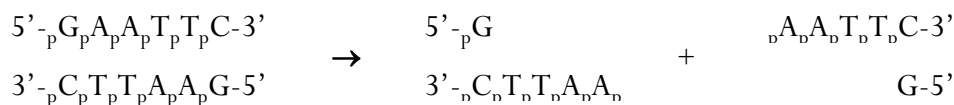
R/M-Typ	Struktur	Kofaktor(en)	Sequenz	DNA-Spaltung
Typ I	R <sub>2</sub> M <sub>2</sub> S	Mg <sup>2+</sup> AdoMet ATP (Hydrolyse)	7bp asymmetrisch unterbrochen	statistisch in großem Abstand Bsp.: <i>EcoB</i> TGA(N <sub>x</sub> )TGCT
Typ II	R <sub>2</sub> , M	Mg <sup>2+</sup>	4-8bp palindrom	innerhalb Bsp.: <i>EcoRI</i> G↓AATTC
Typ IIe	R <sub>2</sub> , M	Mg <sup>2+</sup> zusätzliche Sequenz als Effektor	4-8bp palindrom	innerhalb Bsp.: <i>EcoRII</i> ↓CC(A/T)GG
Typ IIS	R (2 Domänen), M	Mg <sup>2+</sup>	4-7bp asymmetrisch	außerhalb in definiertem Abstand Bsp.: <i>FokI</i> GGATG(9/13)
Typ III	RM	Mg <sup>2+</sup> (AdoMet) ATP (keine Hydrolyse) (DNA)	5-6bp asymmetrisch	außerhalb in definiertem Abstand Bsp.: <i>EcoPI</i> AGACC
Typ IV	R(2)	Mg <sup>2+</sup> (AdoMet)	6bp asymmetrisch	außerhalb in definiertem Abstand Bsp.: <i>Eco57I</i> CTGAAG(16/14)
<i>BcgI</i> -Typ	R <sub>2</sub> M	Mg <sup>2+</sup> AdoMet	unterbrochen	außerhalb in definiertem Abstand auf beiden Seiten Bsp.: <i>BcgI</i> (10/12)GCAN <sub>x</sub> TCG(12/10)



## 1.2 Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Aufgrund ihrer Eigenschaften haben Typ II-Restriktionsendonukleasen eine zentrale Bedeutung für die Molekularbiologie erlangt. Neben ihrem Haupteinsatzgebiet können sie auch als Modellsysteme für Protein-DNA-Wechselwirkungen dienen, deren Untersuchung die Ableitung allgemein gültiger Gesetzmäßigkeiten der DNA-Erkennung und -Bindung, sowie in der anschließenden Katalyse deren hydrolytischer Spaltung ermöglicht.

Die Restriktionsaktivität von *EcoRI* wurde zum ersten Mal 1972 beschrieben [Hedgpeth *et al.*, 1972]. Das *ecoRI*-Gen wurde 1981 kloniert und sequenziert [Greene *et al.*, 1981; Newman *et al.*, 1981]. Das Protein besteht aus 276 Aminosäuren (31kDa), dessen katalytische Aktivität im Homodimer zu beobachten ist [Alves *et al.*, 1982]. Allerdings können auch Tetramere [Modrich & Zabel, 1976] und bei höheren Konzentrationen höhere Polymere gebildet werden [Luke & Halford, 1985], die über eine ausgeprägt schlechte Löslichkeit verfügen und leicht aggregieren [Fritz, 1991; Oelgeschläger, 1992; Engel, 1993; Grabowski, 1993]. Das Enzym ist in der Lage, beliebige DNA-Sequenzen unspezifisch zu binden und anschließend in einem linearen Diffusionsprozeß auf die palindrome, kognate Hexanukleotidsequenz GAATTC zu untersuchen, die hochspezifisch erkannt und gebunden wird [Ehbrecht *et al.*, 1985; Terry *et al.*, 1985; Jeltsch *et al.*, 1994a]. In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen wird die DNA in beiden Strängen gespalten, wobei 5'-überhängende Enden entstehen [Dugaiczky *et al.*, 1974].



Die Geschwindigkeit der Spaltung ist dabei für verschiedene Substrate nicht identisch, sie wird durch benachbarte Sequenzen beeinflusst [Alves *et al.*, 1984; Van Cleve & Gumpert, 1992; Windolph *et al.*, 1997]. Die Methylierung am exozyklischen N6-Atom des inneren Adenins der Erkennungssequenz durch die korrespondierende Methyltransferase verhindert die vollständige Spaltung des DNA-Doppelstranges [Jost & Saluz, 1993; McClelland *et al.*, 1994]. Eine sehr langsame Spaltung unspezifischer oder methylierter Sequenzen kann erfolgen, allerdings kommt es dabei überwiegend zu Einzelstrangbrüchen in der DNA [Jen-Jacobson *et al.*, 1996]. Diese können *in vivo* durch zelleigene Ligasen repariert werden [Taylor *et al.*, 1990] und stellen auf diese Art und Weise für die Zelle keine Gefahr dar, da so in einem *Proofreading*-Mechanismus die Funktion des Enzymes überprüft wird [Heitman, 1992]. Die Spaltung beider DNA-Stränge einer Sequenz, die in einer Base von der kanonischen Erkennungssequenz abweicht (*Star*-Sequenz), konnte für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* durch DNA-Ligase im Reaktionsansatz unterdrückt werden [Taylor & Halford, 1989].

*Star*-Sequenzen werden unter optimalen Pufferbedingungen um den Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  langsamer gespalten als die spezifische Sequenz [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Die Spaltung solcher Sequenzen ist eher möglich, wenn spezielle Pufferbedingungen (zum Beispiel Verwendung von  $Mn^{2+}$ - statt  $Mg^{2+}$ -Ionen [Hsu & Berg, 1978], erhöhter pH-Wert bei gleichzeitig niedriger Ionenstärke [Polisky *et al.*, 1975] oder höhere Konzentrationen an Glycerin oder

organischen Lösungsmitteln [Goodman *et al.*, 1977]) eingestellt werden. Die hohe Spezifität des Enzyms relaxiert, wobei die Geschwindigkeit der Spaltung der kanonischen Sequenz deutlich verlangsamt wird, während *Star*-Sequenzen nun mit nahezu derselben Geschwindigkeit gespalten werden [Gardner *et al.*, 1982; Rosenberg & Greene, 1982].

Eine erste Röntgenstruktur von *EcoRI* im Komplex mit dem kanonischen Oligodesoxynucleotid d(TCGCGAATTCGCG) wurde im Jahre 1986 veröffentlicht [McClarín *et al.*, 1986]. Das daraus erarbeitete Strukturmodell wurde jedoch nach der Analyse von weiteren *EcoRI*-Schwermetallerivaten 1990 korrigiert [Kim *et al.*, 1990], detailliert beschrieben und diskutiert [Rosenberg, 1991]. Die sich vor der Korrektur ergebenden Diskrepanzen mit Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen konnten daraufhin ausgeräumt werden. Die beiden Untereinheiten bilden im Dimer eine annähernd globuläre Struktur von etwa 50Å Durchmesser, die die DNA umschließt. Jede Untereinheit umgreift dazu mit armähnlichen Strukturen, die als *Inner* und *Outer arm* bezeichnet werden, die DNA, die dadurch stark deformiert wird (zentraler Knick) (Abb. 1.1).

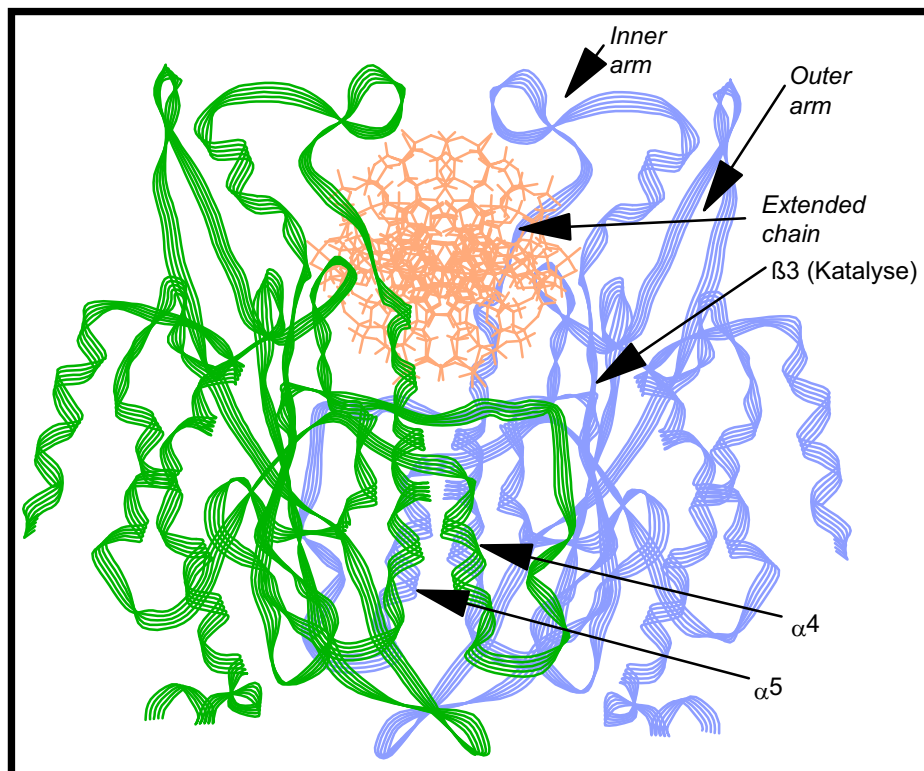


Abb. 1.1: Bändermodell der dimeren Restriktionsendonuklease *EcoRI* im Komplex mit DNA

Jede Untereinheit besteht aus einem zentralen Strukturmotiv, das von einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt und vier  $\alpha$ -Helices gebildet wird (Abb. 1.2). Die Faltblattstränge  $\beta 1$  bis  $\beta 3$  sind antiparallel angeordnet und enthalten die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren Asp91, Glu111 und Lys113. Die Faltblattstränge  $\beta 3$  bis  $\beta 5$  verlaufen parallel und bilden mit den Helices  $\alpha 4$  bis  $\alpha 6$  ein  $\alpha/\beta$ -Bindungsmotiv, das der in vielen Dehydrogenasen auftretenden Nukleotid-bindenden Rossman-Falte ähnelt [Rossman *et al.*, 1975]. Die innere ( $\alpha 4$ ) und die äußere Erkennungshelix ( $\alpha 5$ ) bilden im *EcoRI*-Homodimer ein Vier-Helix-Bündel, dessen Dipolmoment in Richtung auf die DNA weist.

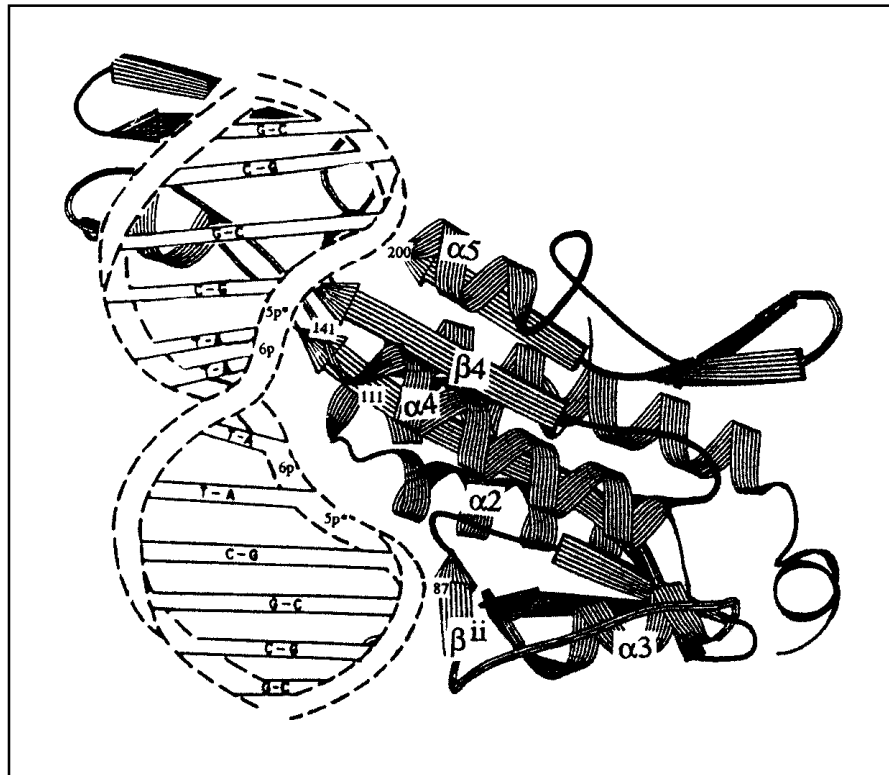


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Peptidrückgrates einer Untereinheit von *EcoRI* im Komplex mit dem tridekameren Oligonukleotid d(TCGCGAATTCGCG) [Rosenberg, 1991]

Die Aminosäuren 137-142 bilden N-terminal der Helix  $\alpha_4$ , das sogenannte *Extended chain*-Motiv, das aufgrund der gestreckten Konformation seines Peptidrückgrates in der großen Grube der gebundenen DNA nahezu parallel eingelagert wird und sowohl mit den Purin- als auch den Pyrimidinbasen der Erkennungssequenz spezifische Wechselwirkungen eingeht. Das *Extended chain*-Motiv wird an der DNA durch das Vier-Helix-Bündel und durch den *Inner arm* (Aminosäuren 124-136), der gemeinsam mit einer antiparallelen Faltblattstruktur (*Outer arm*, Aminosäuren 176-193) um die DNA-Doppelhelix herumgreift, fixiert [Heitman, 1992]. Von diesen drei Strukturanteilen ist die Ausbildung einer Vielzahl von Wasserstoffbrücken und van der Waals-Wechselwirkungen zu den Basen der Erkennungssequenz und Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates möglich [Rosenberg, 1991] (Abb. 1.6).

Eine zentrale Stellung in der Verbindung der DNA-erkennenden Aminosäuren nimmt die Aminosäure Glu144 ein. Über Wasserstoffbrückenbindungen und ihre Ladung wechselwirkt sie mit den Aminosäuren Asn141 und Arg203 derselben sowie den Aminosäuren Arg145 und Lys148 der anderen Untereinheit. Wie gezeigt werden konnte, wird die spezifische Erkennung eines Basenpaares durch die Entfernung eines oder mehrerer Kontakte zur DNA nicht gestört, die Spaltaktivität unter Umständen jedoch stark beeinflusst [Alves *et al.*, 1989a; Geiger *et al.*, 1989]. Zwischen den Faltblattsträngen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  befindet sich ein weiteres Motiv, die  $\beta$ -Brücke, die aus den zwei antiparallel angeordneten Faltblättern  $\beta_i$  und  $\beta_{ii}$ , der Helix  $\alpha_3$  und einem sie verbindenden *Loop* besteht. Sie stellt im aktiven Homodimer über die Aminosäurereste Ile73 und Asn85 Verbindungen zur zweiten Untereinheit her.

### 1.3 Vergleich von *EcoRI* mit anderen Typ II-Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur

Bislang wurden mehr als 2600 Typ II-Enzyme mit etwa 210 Spezifitäten entdeckt [Roberts & Macelis, 1996]. Etwa 60 Gene sind sequenziert und die Proteine zum Teil näher biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Dabei konnten keine klassischen für die DNA-Bindung verantwortlichen Motive bestimmt werden. Mit Ausnahme einiger Iso- und Neoschizomere finden sich dabei im Vergleich der Gesamtsequenzen nur geringe Homologien. Für bestimmte Teilbereiche, die identische funktionelle und strukturelle Eigenschaften aufweisen, können jedoch signifikante Übereinstimmungen gefunden werden [Siksnys *et al.*, 1995].

Zur Zeit sind von insgesamt fünf Typ II-Enzymen Kristallstrukturen veröffentlicht worden. Dabei handelt es sich im einzelnen um *EcoRI* [Kim *et al.*, 1990], *BamHI* [Newman *et al.*, 1994], *EcoRV* [Winkler *et al.*, 1993], *PvuII* [Athanasiadis *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995] und *Cfr10I* [Bozic *et al.*, 1996]. Bei *EcoRI*, *BamHI* und *Cfr10I* handelt es sich um Enzyme, die 5'-überhängende DNA-Enden produzieren, während *EcoRV* und *PvuII* glatte Enden erzeugen (Tab. 1.2).

Tab.1.2: Vergleich der Typ II-Restriktionsenzyme bekannter Struktur

Enzym	Anzahl Aminosäuren	spezifische Sequenz
<i>EcoRI</i>	276	G↓AATTC
<i>BamHI</i>	213	G↓GATCC
<i>Cfr10I</i>	285	Pu↓CCGGPy
<i>EcoRV</i>	245	GAT↓ATC
<i>PvuII</i>	157	CAG↓CTG

Von *BamHI*, *EcoRV* und *PvuII* sind sowohl Kristalle der freien Enzyme als auch solche im Komplex mit DNA gelöst worden, während von *EcoRI* ausschließlich Protein-DNA-Kokristalle existieren (Abb. 1.3). Die Struktur der *Cfr10I* ist aus Kristallen ohne DNA abgeleitet worden.

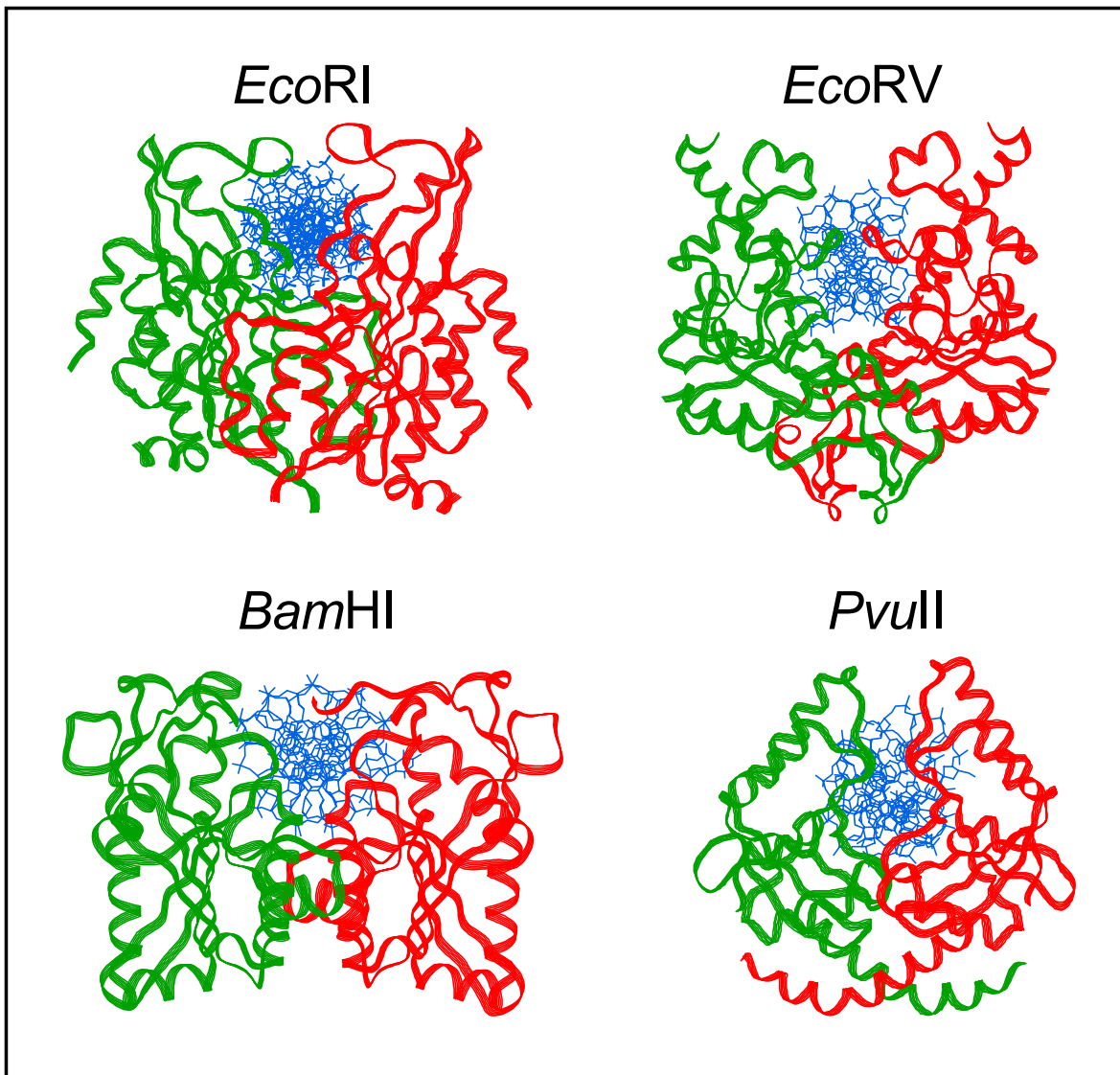


Abb. 1.3: Vergleich der Strukturen von Restriktionsendonucleasen im Komplex mit DNA (*EcoRI*: Kim *et al.*, 1990, *EcoRV*: Winkler *et al.*, 1993, *BamHI*: Newman *et al.*, 1995, *PvuII*: Cheng *et al.*, 1994)

Trotz der Tatsache, daß zwischen den Enzymen keine auffälligen Sequenzhomologien bestehen, ergeben sich aus den Röntgenstrukturdaten überraschenderweise deutliche strukturelle Ähnlichkeiten. Die Homologien beziehen sich auf ein zentrales Strukturmotiv, das aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt besteht und die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren enthält. Bei *EcoRI*, *BamHI*, *Cfr10I* und *EcoRV* wird dieses Motiv auf beiden Seiten zwischen zwei  $\alpha$ -Helices eingebettet, von denen bei *PvuII* lediglich diejenige auf der N-terminalen Seite vorhanden ist (Abb. 1.4) [Venclovas *et al.*, 1994].

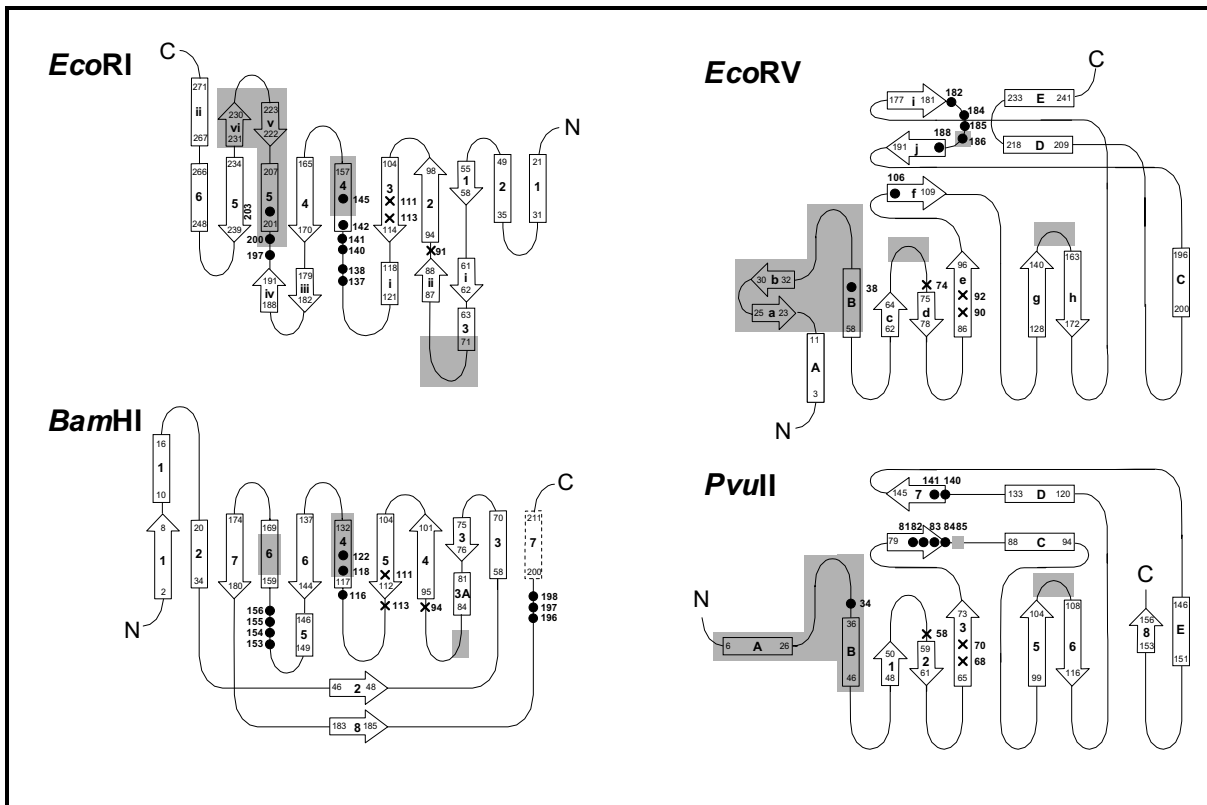


Abb. 1.4: Vergleich der Topologien von *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII* [basierend auf Newman *et al.*, 1994 und Athanasiadis *et al.*, 1994] (X: an der Katalyse beteiligte Aminosäure, •: an der Erkennung von Basen der kognaten Sequenz beteiligte Aminosäure, graue Bereiche: Dimerisierungskontakte)

Die anderen Strukturanteile weisen jedoch deutliche Unterschiede auf. Bei *EcoRI* handelt es sich im Vergleich zu *BamHI* um ein wesentlich kompakteres Enzym, das viele der in diesem Enzym enthaltenen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter, die das Zentralmotiv verbinden, nicht aufweist. Bei *BamHI* fehlen die innere und die äußere Erkennungshelix, die bei *EcoRI* die große Grube der DNA durchkreuzen, und das *Extended chain*-Motiv vollkommen. Weiterhin sind die C- und N-Termini beider Enzyme in Bezug auf das Zentralmotiv vertauscht.

Das zentrale  $\beta$ -Faltblattmotiv enthält das katalytische Zentrum (Abb. 1.5). Dieses wird von drei für die enzymatische Aktivität essentiellen Aminosäuren gebildet. Dabei handelt es sich um je zwei saure und eine basische Aminosäure [Wolfes *et al.*, 1986; King *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989; Selent *et al.*, 1992; Aggarwal, 1995; Grabowski *et al.*, 1995], mit Ausnahme von *BamHI*, bei der drei saure Reste vorhanden sind [Dorner & Schildkraut, 1994].

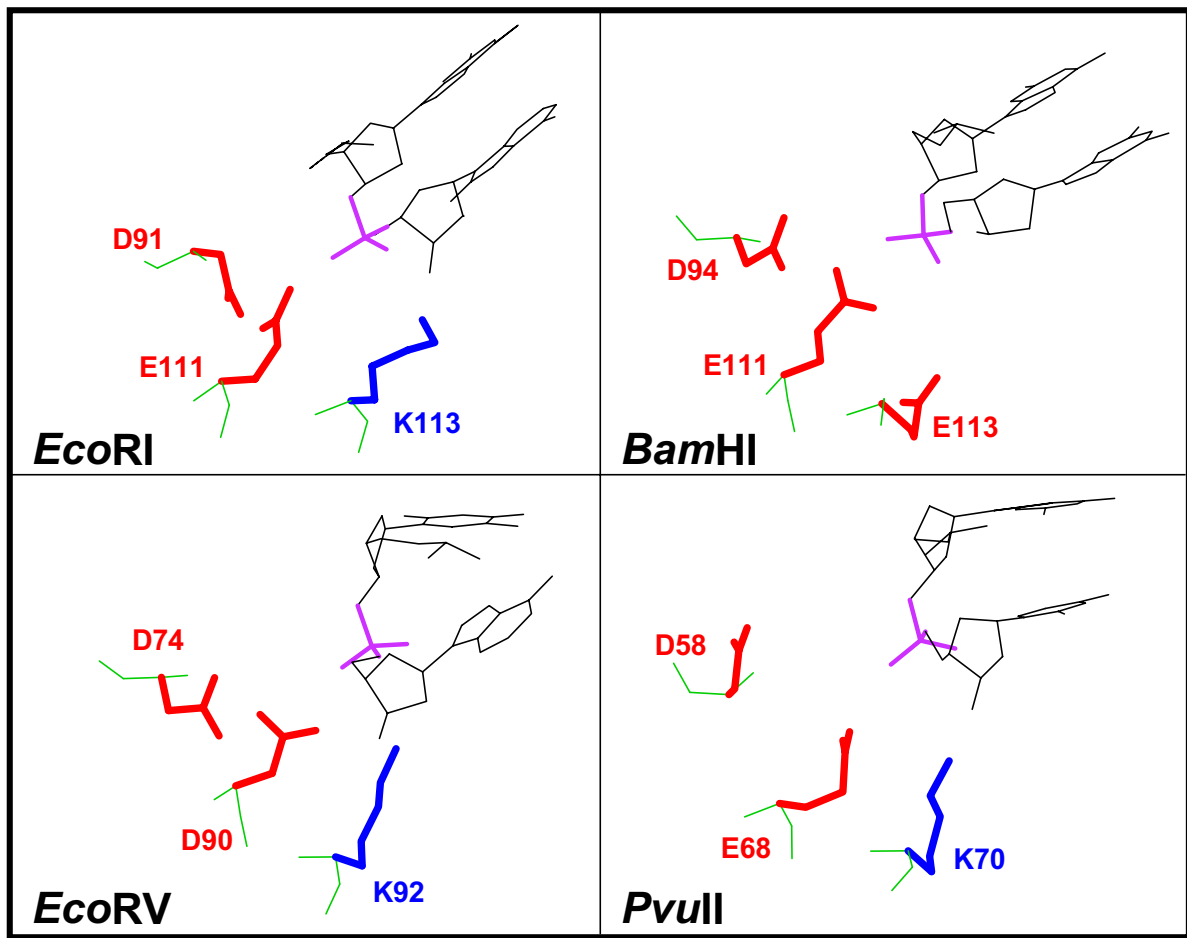


Abb. 1.5: Strukturen der katalytischen Zentren der Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur

Die Lage der katalytisch bedeutsamen Aminosäurereste bezüglich der zu spaltenden Phosphodiesterbindung erweist sich in der Superposition als identisch (*EcoRI*: Asp91, Glu111, Lys113; *BamHI*: Asp94, Glu111, Glu113; *EcoRV*: Asp74, Asp90, Lys92; *PvuII*: Asp58, Glu68, Lys70). Aus diesen Daten wurde ein für das katalytische Zentrum von Restriktionsendonukleasen allgemein gültiges Sequenzmotiv der Zusammensetzung PDX<sub>9-18</sub>(E/D)YK (X-beliebiger Rest, Y-hydrophober Rest) abgeleitet [Selent *et al.*, 1992]. Dieses muß jedoch nicht unbedingt indikativ sein, so enthält *EcoRI* dieses Motiv zweimal, ohne daß dadurch zwei katalytische Zentren entstehen würden. Bei *Cfr10I*, einem Enzym mit degenerierter Sequenzerkennung, war die Zuordnung von Aminosäuren homologer Position bislang nicht eindeutig möglich, sie weicht von diesem Motiv recht deutlich ab. Zwei zu Pro90 und Asp91 bei *EcoRI* korrespondierende Reste sind zwar vorhanden, die zweite Hälfte des Motivs hingegen beinhaltet in dem zu *EcoRI* und *EcoRV* strukturell äquivalenten Element Reste auf einer  $\alpha$ -Helix, von der die Autoren annehmen, daß sie keine spezifischen Kontakte zur DNA ausbildet [Bozic *et al.*, 1996]. Da bislang jedoch lediglich der DNA-freie Kristall gelöst wurde und sich durch die DNA-Bindung deutliche Strukturveränderungen ergeben können, müssen weitere Röntgenstrukturuntersuchungen abgewartet werden.

## 1.4 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion

Bevor die DNA-Spaltung erfolgen kann, muß *EcoRI* zunächst ihr Substrat erkennen und binden. Diese Bindung kann sowohl an unspezifischen als auch an spezifischen Sequenzen erfolgen [Langowski *et al.*, 1980; Woodhead & Malcolm, 1980]. Da spezifische Sequenzen im Vergleich zu unspezifischen deutlich unterrepräsentiert sind (4095:1 Sequenzen für ein definiertes Hexanukleotid), erfolgt die diffusionskontrollierte Assoziation nahezu ausschließlich an unspezifischen Bindungsstellen. Unspezifische DNA-Bindung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA vermittelt und ist stark abhängig von der Ionenstärke. Dazu umgreift das Enzym mit seinen Armstrukturen die DNA und bewegt sich auf der Suche nach seiner spezifischen Sequenz auf dieser entlang, wobei es deren helikaler Windung folgt [Jeltsch *et al.*, 1994a]. Die unspezifische DNA-Bindung ist Voraussetzung für die anschließende lineare Diffusion. Die Geschwindigkeit mit der sich *EcoRI* auf der DNA bewegt, beträgt dabei etwa  $7 \times 10^6 \text{ bp s}^{-1}$  [Ehbrecht *et al.*, 1985], wobei während eines einzigen Bindungsereignisses durch das Enzym mehrere tausend Basenpaare überprüft werden. *Star*-Sequenzen verursachen während der linearen Diffusion längere Pausen (bis zu 20 Sekunden Verweildauer), da diese deutlich fester gebunden werden als nichtspezifische DNA [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990].

Die einzige Restriktionsendonuklease, für die auch ein Komplex mit unspezifischer DNA gelöst wurde, ist *EcoRV* [Winkler *et al.*, 1993]. Dabei wurden lediglich Kontakte des Proteins mit dem Phosphatrückgrat der DNA beobachtet, direkte Interaktionen mit den Basen traten nicht auf. Die Strukturanteile, welche im kognaten Komplex für die Basenerkennung verantwortlich sind, wirken im nichtkognaten Komplex ungeordnet. Weiterhin tritt der zentrale Knick der DNA, der auch für dieses Enzym charakteristisch ist, nicht auf, wodurch das katalytische Zentrum bezüglich der zu spaltenden Bindung nicht optimal positioniert werden kann. Große Teile des verbleibenden Raumes zwischen Protein und DNA sind anscheinend mit Wassermolekülen und Ionen besetzt [Sidorova & Rau, 1996], welche freigesetzt werden, wenn es zur Bildung des spezifischen Komplexes kommt, wobei direkte Kontakte zwischen der DNA und dem Protein möglich werden.

## 1.5 Spezifische DNA-Bindung

Die *EcoRI*-Erkennungssequenz GAATTC weist eine B-DNA-ähnliche Konformation auf [Lane *et al.*, 1991]. Wie sich aus Röntgenstrukturdaten des Protein-DNA-Komplexes ergibt, treten durch die Bindung des Enzymes jedoch starke Konformationsänderungen auf. In der Mitte der kognaten Sequenz tritt als Ergebnis einer lokalen Entwindung (etwa  $28^\circ$ ), die die Doppelhelix um  $3,5 \text{ \AA}$  weitet, ein Knick auf [Rosenberg, 1991].

Bei der spezifischen Bindung werden durch mehrere Strukturelemente jeder Untereinheit direkte und indirekte Kontakte zu verschiedenen Basen jeder Halbseite der Erkennungssequenz und zu Phosphaten des DNA-Rückgrates ausgebildet (Abb.1.3). Zwei Helices jeder Unterein-



heit bilden gemeinsam ein Vier-Helix-Bündel, sie können über Aminosäurereste ihrer N-Termini Wechselwirkungen in Richtung der großen Grube der DNA eingehen. Das *Extended chain*-Motiv lagert sich parallel zur großen Grube der DNA ein. Das  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 3), welches die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren enthält, richtet sich parallel zum DNA-Rückgrat aus und bildet Kontakte mit Phosphaten innerhalb der Erkennungssequenz aus. *Inner* und *Outer arm* umgreifen die DNA und wechselwirken mit zusätzlichen Phosphatgruppen außerhalb der Erkennungssequenz. Der überwiegende Anteil der Wechselwirkungen findet in Richtung der großen Grube der DNA statt, wobei mit jeder Base mehr als ein direkter oder indirekter Kontakt aufgenommen wird (Abb. 1.6).

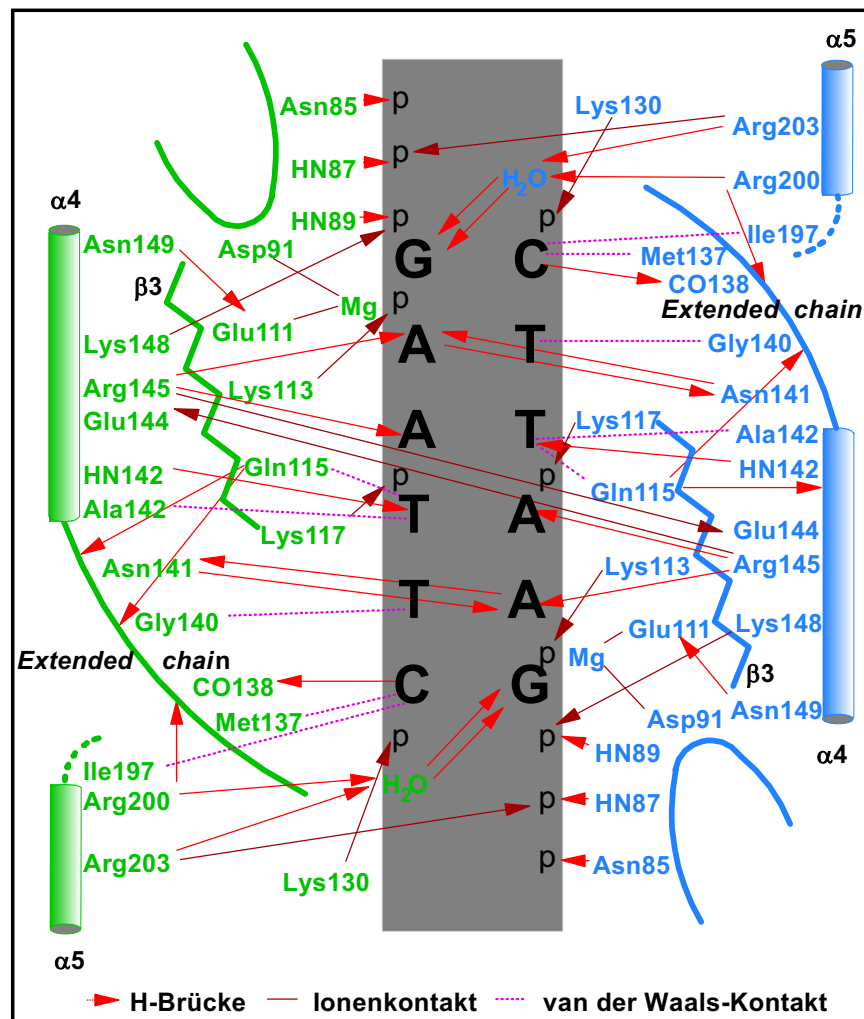


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Kontakte beider Untereinheiten von *EcoRI* mit seiner spezifischen Erkennungssequenz

Dabei kommen dem *Extended chain*-Motiv sowie dem N-terminalen Teil der Helix  $\alpha$ 4 die größte Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, daß ein Dodekapeptid, dessen Aminosäuresequenz diesem Proteinanteil entspricht (Met137-Arg145), in der Lage ist, DNA mit hoher Spezifität allerdings geringer Affinität zu binden [Jeltsch *et al.*, 1995b]. Viele der kontaktierenden Aminosäuren wurden in Mutageneseexperimenten untersucht. Jeder der gebildeten Kontakte kann entfernt werden, ohne daß es dadurch zu einer verminderten Diskriminierung durch das Enzym bezüglich seiner Erkennungssequenz käme. Die Substitution führt unter Umständen zu

einem dramatischen Verlust an katalytischer Aktivität, nicht jedoch zu einer Veränderung der Spezifität des Enzymes [Wolfes *et al.*, 1986; Yanofsky *et al.*, 1987; Geiger *et al.*, 1989; Alves *et al.*, 1989; Needels *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989; Osuna *et al.*, 1991; Selent *et al.*, 1992; Jeltsch *et al.*, 1993a; Flores *et al.*, 1995]. Der Erkennungsprozeß ist damit hochredundant. Durch das Enzym werden praktisch alle Kontakte ausgebildet, die für eine mögliche Wechselwirkung überhaupt existieren.

Die Bindung der kognaten Sequenz ist eng an die Katalyse gekoppelt. Auch Aminosäureaustausche, die Reste betreffen, welche nicht direkt an der spezifischen Bindung oder Katalyse beteiligt sind, sondern Substrukturen des Proteins verbinden und in der Kopplung eine zentrale Rolle spielen, sind für *EcoRI* durch gezielte Mutageneseexperimente untersucht worden. Wird die Kommunikation verschiedener Strukturen innerhalb einer Untereinheit gestört, so wird der Kopplungsprozeß zwischen spezifischer Bindung und Spaltung der Phosphodiesterbindung stark beeinflusst [Jeltsch *et al.*, 1993a; Jeltsch, 1994].

Die Ausbildung des kognaten Komplexes wird aufgrund der großen Anzahl zusätzlicher Kontakte im Vergleich zum unspezifischen Komplex thermodynamisch stark bevorzugt. Da durch die spezifische Bindung eine deutliche Veränderung der ursprünglichen B-DNA-Form hervorgerufen wird, ergibt sich daraus eine gleichzeitige strukturelle Adaption von Protein und DNA (*Induced fit*). Diese lokalen Konformationsänderungen werden durch Wechselwirkungen zwischen den AT-Basenpaaren der Erkennungssequenz untereinander stabilisiert. Die N6-Atome der äußeren Adenine bilden mit den O4-Atomen der Carbonylgruppen der beiden gegenüberliegenden Thyminen trizentrische Wasserstoffbrücken. Die Thyminen interagieren durch van der Waals-Wechselwirkungen, die über die C5-Methylgruppen ausgebildet werden. Die zentralen Basenpaare können so keine *Stacking*-Wechselwirkungen mehr eingehen, was zur optimalen Positionierung der aktivierenden Gruppen der Katalyse führt. Die Erkennung der kognaten Sequenz und ihre Spaltung werden auf diese Weise unmittelbar miteinander verknüpft. Kooperative Konformationsänderungen in Protein und DNA ergeben letztlich den katalytisch aktiven Komplex [Jeltsch *et al.*, 1993a].

Die meisten Restriktionsendonukleasen benötigen für die spezifische DNA-Bindung keine divalenten Kationen, einige Enzyme zeigen jedoch ein abweichendes Verhalten. So vermag *EcoRV* nur in Gegenwart solcher Ionen DNA spezifisch zu binden. Zum Beispiel ermöglicht  $\text{Ca}^{2+}$  die Bindung, ohne daß durch dieses Ion die Spaltung vermittelt wird [Vipond & Halford, 1995; Engler *et al.*, 1997]. In Abwesenheit divalenter Kationen findet lediglich unspezifische Bindung statt. Ein identisches Verhalten konnte auch für eine katalytisch inaktive Mutante gezeigt werden, bei der es nur in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  zur Ausbildung spezifischer Komplexe kam, wobei durch die eingeführten Aminosäuren eine Bindung von Kationen im katalytischen Zentrum nicht mehr möglich war [Thielking *et al.*, 1992; Jeltsch *et al.*, 1995a]. Auch *PaeR7* [Ghosh *et al.*, 1990], *TaqI* [Zebala *et al.*, 1992], *Cfr9I* [Siksny & Plekaityte, 1993] und *MunI* [Lagunavicius *et al.*, 1997] sowie einige *EcoRI*-Mutanten [Windolph & Alves, 1997] benötigen divalente Kationen für die spezifische DNA-Bindung. Andererseits existieren *MunI*-Mutanten, die auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  DNA-Bindungsfähigkeit aufweisen, die der des Wildtypenzym bei pH6,5 oder in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entspricht [Lagunavicius & Siksny, 1997].

## 1.6 Katalysemechanismen der DNA-Spaltung

Der Vergleich der Kristallstrukturen der Protein-DNA-Komplexe von *EcoRI* und *EcoRV*, die als erste Typ II-Enzyme gelöst wurden, ergab in der Superposition eine auffallende Übereinstimmung der räumlichen Anordnung der für die Katalyse wichtigen Aminosäuren bezüglich der zu spaltenden Phosphodiesterbindung. Diese Beobachtung bestätigte sich auch, wie oben beschrieben, für die später gelösten Strukturen von *BamHI* und *PvuII* [Grabowski *et al.*, 1996]. Eine eindeutige Zuordnung der Reste des katalytischen Zentrums aus den Röntgenstrukturdaten war aufgrund der Notwendigkeit, daß die Protein-DNA-Kokristalle in Abwesenheit des essentiellen Faktors  $Mg^{2+}$  gewonnen werden mußten, um die Spaltung des Substrates zu vermeiden, nicht möglich. Die aus weiteren biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse ergeben jedoch in ihrer Gesamtheit eine detaillierte Vorstellung des molekularen Mechanismus der DNA-Spaltung. Aufgrund dessen wurde 1992 ein Modell der substratunterstützten Katalyse als möglicher Mechanismus für die DNA-Spaltung veröffentlicht (Abb. 1.7) [Jeltsch *et al.*, 1992].

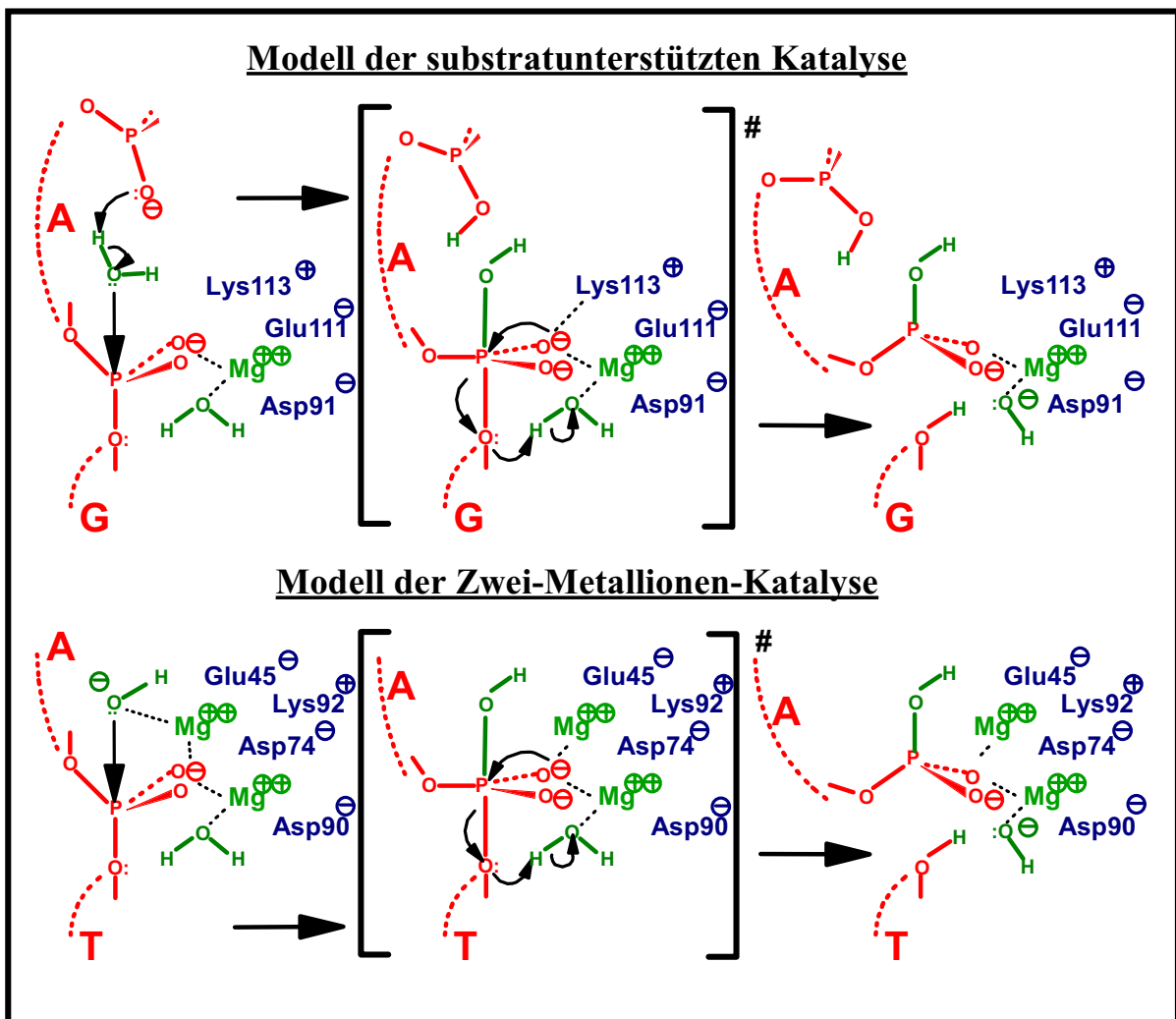


Abb. 1.7: Vergleich der postulierten Mechanismen der substratunterstützten Katalyse [Jeltsch *et al.*, 1992] und der Zwei-Metallionen-Katalyse [Kostrewa & Winkler, 1995]

Bei der substratunterstützten Katalyse wird durch die Phosphatgruppe, die der zu spaltenden Phosphodiesterbindung in 3'-Richtung direkt benachbart ist, von einem Wassermolekül ein Proton abstrahiert, wodurch dessen Nukleophilie gesteigert wird. Durch die Verwendung modifizierter Oligodesoxynukleotide konnte gezeigt werden, daß das negativ geladene pro-R<sub>P</sub>-Phosphorylsauerstoffatom für die Aktivierung essentiell ist. Substrate, denen diese Phosphatgruppe in einem Strang fehlt, werden nur im Gegenstrang gespalten. Wird diese Gruppe durch H-Phosphonate ersetzt, so findet eine um mindestens vier Zehnerpotenzen verlangsamte Spaltung statt. Bei Verwendung von Phosphothioaten als Substrat, werden nur dann beide Stränge gespalten, wenn das negativ geladene Schwefelatom an der oben bezeichneten Position sitzt [Jeltsch *et al.*, 1993b]. Die Bedeutung der Ladung des aktivierenden Phosphates konnte für *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII* nachgewiesen werden, jedoch für *Cfr10I* nicht so deutlich erkennbar [Jeltsch *et al.*, 1995].

Das so aktivierte Wasser kann in einem S<sub>N</sub>2-ähnlichen Mechanismus *in line* die Phosphatgruppe in Richtung der zu lösenden Bindung angreifen [Gerlt, 1993]. Die Hydrolyse erfolgt auf der 3'-Seite und ergibt so ein 5'-Phosphat, sie verläuft unter Inversion der Konfiguration der reaktiven Phosphatgruppe [Connolly *et al.*, 1984]. Das Mg<sup>2+</sup>-Ion wird durch zwei saure Aminosäuren (*EcoRI*: Asp91 und Glu111) positioniert. Es polarisiert die nicht zum Phosphatrückgrat der DNA gehörenden P-O-Bindungen der zu spaltenden Phosphodiesterbindung, wodurch die Elektrophilie des Phosphatatoms gesteigert wird. Ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe kann dabei Teil der Koordinationssphäre des Mg<sup>2+</sup>-Ions sein und seine negative Ladung auf diese Weise effektiv kompensiert werden. Dadurch wird der Übergang der tetragonalen Geometrie des Phosphatesters in den trigonal bipyramidalen Übergangszustand erleichtert [Heitman, 1992]. Ein Eindiffundieren zweiwertiger Kationen (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) in einen *EcoRI*-DNA-Kokristall führte zu einer *In situ*-Spaltung des Substrates, wobei sich das Kation in der Röntgenstruktur zwischen dem Glu111 und dem postreaktiven Phosphat findet [Rosenberg, 1991]. Weiterhin wird die im Übergangszustand auftretende zusätzliche negative Ladung durch eine basische Aminosäure (*EcoRI*: Lys113) neutralisiert. Nach Spaltung der Phosphodiesterbindung wird durch ein Wassermolekül aus der Koordinationssphäre des Mg<sup>2+</sup>-Ions die Fluchtgruppe protoniert.

Die Anwesenheit zweier saurer und einer basischer Aminosäure im katalytischen Zentrum wird bei *EcoRI*, *EcoRV* und *PvuII* erfüllt. Für *BamHI* stellt sich eine andere Situation dar, da für dieses Enzym drei essentielle saure Aminosäurereste nachgewiesen wurden (Abb. 1.5) [Xu & Schildkraut, 1991; Dorner & Schildkraut, 1994].

Asp94 und Glu111 von *BamHI* sind homolog zu den sauren Aminosäuren der anderen beschriebenen Enzyme. Glu113 hingegen befindet sich an einer Position, an der sich bei den anderen Enzymen eine basische Aminosäure findet. Weder die Mutante E113K von *BamHI* noch die Mutante K113E von *EcoRI* zeigen eine katalytische Aktivität [Dorner & Schildkraut, 1994; Grabowski, 1995]. Die entsprechende *EcoRV*-Mutante (K92E) zeigt hingegen, zumindest in Gegenwart von Mn<sup>2+</sup>-Ionen, Spaltaktivität [Selent *et al.*, 1992]. Ein Glutaminrest mit gebundenem Mn<sup>2+</sup>-Ion kann anscheinend funktionell wenigstens teilweise einen Lysinrest ersetzen.

Einige Kokristalle von *EcoRV*, in die man Mg<sup>2+</sup> oder andere Schwermetallionen eindiffundieren ließ, wiesen in der Nähe der zu spaltenden Phosphodiesterbindung Elektronendichten auf, die zwei divalenten Kationen entsprachen [Winkler *et al.*, 1993]. Durch Mutageneseuntersu-

chungen konnten die Positionen Asp74 und Asp90 als für die Katalyse essentiell identifiziert werden, sie bilden eine Kationenbindungsstelle aus [Thielking *et al.*, 1991]. Das zweite Kation konnte nur in einigen Kristallen festgestellt werden, allerdings war ein eindeutiger Nachweis in einem Produktkristall möglich. Diese weitere Bindungsstelle wurde dort von Glu45 und Asp74 gebildet (Abb. 1.5). Für *EcoRV* wurde daher ein alternativer Katalysemechanismus (Abb. 1.7) postuliert [Kostrewa & Winkler, 1995], bei dem zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen an der Katalyse beteiligt sind. Das angreifende Wassermolekül wird hierbei durch eines dieser Ionen aktiviert, während das zweite Ion auch hier die zu spaltende Bindung polarisiert. Für *BamHI* und *PvuII* konnte aus den Kristallstrukturen eine saure Aminosäure an homologer Position identifiziert werden (*BamHI*: Glu77, *PvuII*: Glu55), die möglicherweise an der Bindung eines zweiten Kations im katalytischen Zentrum beteiligt ist.

## 1.7 Sequenzhomologien zwischen *EcoRI* und *MunI*

Restriktionsenzyme weisen im Vergleich ihrer Aminosäuregesamtsequenzen keine nennenswerten Homologien auf. Beschränkt sich ein Vergleich jedoch auf bestimmte Teilbereiche der Proteine, so können sich sowohl in funktioneller wie anscheinend struktureller Hinsicht Übereinstimmungen ergeben, die sich in einer hohen Aminosäurehomologie widerspiegeln, insbesondere wenn Proteine verglichen werden, die partiell überlappende Erkennungssequenzen besitzen (Abb. 1.8).

<i>MunI</i>	1		MGKSEL	SGRLNWQALAGLKASGAEQN		
<i>EcoRI</i>	1	MSNKKQSNRLTEQHKLSQGVIGIFGDYAKAHDLAVG	EVSKLVKKALSNEY			
<i>MunI</i>	27	LYNVFNAVFE	GTKYVLYEKP	KHLKN-LYAQVVL	PDDVIKEIFNPLIDLSTTQWGV	I
<i>EcoRI</i>	51	PQLSFRYRDSIKKTEINEALKKIDPDLGGTLFVSNSSIK				
<i>MunI</i>	83	PDFAI-ENTE	-----THKILFGEIKRQ	-----DGWVEGK--DPS-AGR	GNAHER	III
<i>EcoRI</i>	90	PDGGIVEVKDDYGEWRVVLVAEAKHQGKDIINIRNGLLVGKRGDQDLMAAGNAIER				
<i>MunI</i>	123	SCKLFTGLLPKAYRTIGGINDEEILPFWVVFEGD	-----ITRDPKRVREITFW			IV V
<i>EcoRI</i>	146	SHKNISEIANFML-----SESHFPYVLFLEGSNFLTENISITRPDGRVVNLEYN				
<i>MunI</i>	171	YDHYQDNFYFMWRPNESGEKLVQHFNEK	LKKYLD			VI
<i>EcoRI</i>	195	SGILNRLDRLTAANYGMPINSNLCINKFVNHKDKSIMLQAASIY	TQDGDREWDSKI			
<i>EcoRI</i>	251	MFEIMFDISTTSLRVLGRDLFEQLTSK				

Abb. 1.8: Alignment der Aminosäuresequenzen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *MunI* (rot: identische Aminosäuren, grün: ähnliche Aminosäuren)

Die Restriktionsendonuklease *MunI* erkennt und spaltet spezifisch die Sequenz C↓AATTG, wobei die zentrale Tetranukleotidsequenz und die Position der zu spaltenden Phosphodiesterbindung zu *EcoRI* identisch sind. *MunI* (203 Aminosäuren) und *EcoRI* (276 Aminosäuren) besitzen im Vergleich ihrer Gesamtsequenzen 34 identische und 56 funktionell verwandte Aminosäuren (Abb.1.8), was einer Sequenzhomologie von 16% entspricht [Siksnys *et al.*, 1994]. In den gekennzeichneten, konservierten Teilbereichen (I-V) liegt die Übereinstimmung dagegen im Bereich zwischen 75-100%. Die Ähnlichkeit beider Enzyme könnte in gemeinsam genutzten Strukturelementen für die Erkennung der zentralen AATT-Sequenz begründet sein.

Die Bereiche I und II enthalten das zentrale  $\beta$ -Faltblattmotiv mit den an der Katalyse beteiligten Aminosäuren, wie sie aus der Kristallstruktur für *EcoRI* abgeleitet wurden [Kim *et al.*, 1990]. Die entsprechenden Aminosäuren Asp83, Glu98 und Lys100 von *MunI* wurden in Mutageneseuntersuchungen als essentiell für die Katalyse bestätigt [Lagunavicius & Siksnys, 1997]. Das Motiv III beinhaltet das *Extended chain*-Motiv und einen Teil der inneren Erkennungshelix von *EcoRI*, sie bilden gemeinsam mit Gln115 (Motiv II) Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kontakte mit der zentralen AATT-Sequenz aus. Die Struktur motive IV und V gewährleisten die korrekte Orientierung der DNA-erkennenden Elemente des Enzyms.

Die Aminosäuren des Motives VI hingegen sind Teile eines *Loops* und der äußeren Erkennungshelix, die die Diskriminierung der äußeren Basen der Hexanukleotidsequenz ermöglichen. In diesem Bereich besteht im Gegensatz zu den anderen Struktur motiven keine so deutliche Sequenzhomologie. Die G/C-Erkennung wird bei *EcoRI* durch die Aminosäurereste Met137, Ala138, Arg200 und Arg203 vermittelt, diese sind bei *MunI* nicht konserviert.

## 1.8 Ziele der Arbeit

### 1.8.1 Untersuchungen zum Mechanismus der durch *EcoRI* katalysierten Spaltung von DNA

Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob für die Spaltung von Phosphodiesterbindungen durch Restriktionsenzyme ein allgemeingültiger Katalysemechanismus angenommen werden kann. Die beiden postulierten Modelle der DNA-Spaltung bedingen für die Proteine unterschiedliche Voraussetzungen der Kationenbindung und der dafür verantwortlichen Aminosäurereste.

### 1.8.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von *EcoRI*

Die Existenz wenigstens zweier Kationenbindungsstellen bei *EcoRV*, führte zur Entwicklung des Modells der Zwei-Metallionen-Katalyse (Abb. 1.7). Um zwei Kationen binden zu können, bedarf es dabei innerhalb des aktiven Zentrums mindestens dreier saurer Aminosäuren. Aufgrund der Protein-DNA-Kristallstrukturen von *EcoRV*, konnten bei dieser Restriktionsendonuklease für diese Funktion die Positionen Asp74/Asp90 und Glu45/Asp74 zugeordnet werden (Abb.1.8). Aus dem Vergleich der Kristallstrukturen von *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV* und *PvuII* konnte für *EcoRI* eine zusätzliche potentiell kationenbindende Aminosäure ermittelt werden (Abb. 1.8) [Cheng *et al.*, 1995].

Eine  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle wird von den Aminosäureresten Asp91 und Glu111 gebildet, Asp91 könnte gemeinsam mit Asp59 analog zu *EcoRV* eine weitere Möglichkeit der Kationenbindung erlauben. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, sollen Mutanten der Aminosäureposition Asp59 erstellt und bezüglich ihrer Funktion für die Katalyse untersucht werden. Die saure Aminosäure soll durch zielgerichtete Mutagenese gegen Alanin, Glutaminsäure, Glycin, Lysin und Asparagin ausgetauscht werden.

Die Versuchsergebnisse sollen dazu beitragen, zu klären, ob sich bezüglich der durch Restriktionsenzyme des Typs II durchgeführten Spaltung von Phosphodiesterbindungen ein einheitlicher Katalysemechanismus ableiten läßt.

### 1.8.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von *EcoRI*

Verschiedene Enzyme, die die Bildung oder Spaltung von Phosphodiesterbindungen katalysieren, nutzen zu diesem Zweck divalente Kationen, die sie sowohl für die Bindung des negativ geladenen Substrates als auch für die nukleophile Verschiebung der auftretenden Ladungen benötigen [Knowles, 1980]. Die Art des an der Katalyse beteiligten Kations ist dabei von Enzym zu Enzym unterschiedlich und reicht von Erdalkali- bis zu Übergangsmetallen.

Am Beispiel der Ribonuklease H konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, durch die Einführung gezielter Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum des Enzyms ein kationenunabhängiges, katalytisch aktives Protein zu erzeugen [Casareno *et al.*, 1995]. Im aktiven Zentrum von *EcoRI* sollen durch die Einführung für Arginin-, Cystein- beziehungsweise Histidinresten an den für die Kationenbindung relevanten Positionen (Asp91, Glu111) die Einzelmutanten D91C, D91R und E111H, E111R sowie die Doppelmутanten D91C/E111C, D91H/E111H und D91R/E111R erstellt werden. In den anschließenden Untersuchungen soll festgestellt werden, ob die angestrebten Mutanten eine veränderte Kationenspezifität aufweisen, also andere Kationen als das physiologische  $Mg^{2+}$  bevorzugt binden ( $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$ ) oder analog zum oben aufgeführten Beispiel unter speziellen Pufferbedingungen sogar eine kationenunabhängige Spaltaktivität aufweisen. Dazu werden auch die bereits vorhandenen Mutanten D91H, E111C, D91C/E111H und D91H/E111C eingesetzt [Brügner, 1994].

## 1.8.2 Entwicklung von positiven *In vivo*-Selektionssystemen zur Anreicherung modifizierter *EcoRI*-Proteine

Da die möglichen Wechselwirkungen eines Restriktionsenzymes mit seiner spezifischen Erkennungssequenz, wie sie sich aus Kristallstrukturen, Versuchen mit chemisch modifizierten Substraten und Mutageneseuntersuchungen ergeben, ein Netzwerk zahlreicher Kontakte darstellt, ist es kaum erfolgversprechend, die Spezifität eines solchen Proteins durch gezielte Mutagenese verändern zu wollen. Erschwerend kommt hinzu, daß die Kopplung zwischen spezifischer Bindung und der Katalyse auf kooperativen Veränderungen der DNA- und der Proteinstruktur gleichermaßen beruhen.

Durch die Anwendung von positiven *In vivo*-Selektionssystemen kann eine große Zahl mutierter Proteine gleichzeitig in einem Ansatz untersucht und eine gewünschte Eigenschaft gezielt angereichert werden. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Etablierung von Anreicherungssystemen, die eine Selektion von Enzymvarianten mit veränderter Spaltspezifität oder DNA-Bindungsaktivität erlauben. Entstammen die Proteine einer Zufallsmutagenese, so können auf diese Weise auch Mehrfachmutanten dargestellt werden.

### 1.8.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Spaltspezifität

Zur gezielten Anreicherung von Enzymvarianten mit veränderter Sequenzspezifität soll ein Selektionssystem entwickelt werden, das von Plasmiden ausgeht, die ein zufallsmutiertes Endonukleasegen tragen. Mit dem Plasmidpool sollen Bakterienzellen transformiert und spaltaktive Enzyme selektiert werden.

Das System soll aufgrund der unter 1.7 aufgeführten deutlichen Homologien zwischen *EcoRI* und *MunI* auf *EcoRI* angewendet werden, deren spezifische Erkennung und Spaltaktivität durch Zufallsmutagenese in eine *MunI*-Aktivität umgewandelt werden soll. Die grundsätzliche Funktionalität des Selektionssystemes soll ohne vorhergehende Mutagenese mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* unter Verwendung von Plasmiden, die die Gene für das Wildtypenzym oder eine spaltinaktive Mutante tragen, überprüft werden. Die einzusetzenden Bakteriophagen sollen kloniert und das toxische Gen durch „stille“ Mutationen mit Spaltstellen für *MunI* und *EcoRV* versehen werden.

### 1.8.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität

Mit einem weiteren Selektionssystem soll die Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten, die eine veränderte Bindungsspezifität aufweisen, aber ein inaktiviertes katalytisches Zentrum besitzen,



erreicht werden. Dazu soll die generelle Organisation von prokaryontischen Operonen, wie sie die negative Regulation des *lac*-Operons bietet, verwendet werden.

Eine dem *lac*-Repressor analoge Wirkung auf die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit können auch andere DNA-bindende Proteine entfalten (Pseudorepressoren), sofern im Promotor-Operator-Bereich entsprechende Bindungsstellen vorhanden sind. Um die Funktionalität des Systems nachzuweisen, soll zunächst eine Selektion bindungsaktiver, spaltinaktiver *EcoRI*-Mutanten, wie sie bereits aus Mutageneseexperimenten hervorgegangen sind, durchgeführt werden. Dazu müssen in den *lac*-Promotorbereich GAATTC-Sequenzen eingeführt werden, die den Promotor auf beiden Seiten direkt flankieren. Mit dem erhaltenen Plasmid sollen Bakterienzellen transformiert werden, in denen die Expression von *EcoRI*-Proteinen gezielt induziert werden kann.

## 2.0 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden dargestellt und gegebenenfalls erläutert. In diesem Zusammenhang sei insbesondere auf folgende Laborhandbücher verwiesen: *Molecular Cloning* [Sambrook *et al.*, 1989], *Current Protocols in Molecular Biology* [Ausubel *et al.*, 1987] und *Current Protocols in Protein Science* [Coligan *et al.*, 1995].

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, in analysenreiner oder speziell für mikrobiologische beziehungsweise molekularbiologische Anforderungen geeigneter Qualität, von den Firmen Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Amersham Buchler, Boehringer Mannheim, BioTech Trade&Service, ICN Biomedicals, J.T. Baker, Fluka, Merck, Pharmacia, Riedl-de Haën, Saxon Biochemicals, Schleicher&Schüll, Serva und Sigma bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen AGS, Boehringer Mannheim, InViTek, Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Stratagene und United States Biochemical bezogen und, sofern nicht anders vermerkt, in den zugehörigen Reaktionspuffern entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.2 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1 Nährmedien

Als Vollmedium wird für alle Stämme Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet.

LB-Medium: 10g Hefeextrakt (Gibco-BRL)  
 10g Pepton Nr. 140 (pankreatisches Casein-Hydrolysat, Gibco-BRL)  
 5g NaCl  
 ad 1l ddH<sub>2</sub>O (pH7,5, NaOH)

Für feste Nährböden werden 15g Bacto-Agar (Gibco-BRL)/l Medium zugesetzt.

Alle Medien werden vor ihrer Verwendung autoklaviert (120°C, 30min). Bei Festmedien werden die nicht thermostabilen Antibiotika entsprechend Tab. 2.1 erst hinzugefügt, wenn die Kulturflüssigkeit auf etwa 50°C abgekühlt ist. Flüssigmedien werden sie unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.

Tab. 2.1: Konzentrationen der in Kulturmedien verwendeten Antibiotika

Antibiotikum:	Konzentration (µg/ml) in	
	Flüssigmedien:	Festmedien:
Ampicillin (Amp)	100	75
Chloramphenicol (Chl)	30	20
Kanamycin (Kan)	100	75
Tetracyclin (Tet)	10	10

## 2.2.2 Bakterielle Vorkulturen

Bakterielle Vorkulturen werden in LB-Medium gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika (siehe Tab. 2.1) herangezogen, sofern keine besonderen Anforderungen gestellt werden. Sollen die Zellen mit Bakteriophagen infiziert werden, so müssen diese je nach Phagenart unterschiedlichen Kulturvorbedingungen ausgesetzt werden, um für die anschließende Infektion möglichst günstige Voraussetzungen zu schaffen.

### 2.2.2.1 Vorkulturen für die Infektion mit λ-Phagen

Eine 20ml-LB-Kultur wird mit 0,2% (w/v) Maltose und 10mM MgSO<sub>4</sub> versetzt und der entsprechende Stamm (möglichst von einer frischen LB-Platte) bei 37°C darin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,2-0,5 angezogen, diese ist bei 4°C für einige Tage stabil. Aus dieser Vorkultur können die Zellen entweder direkt für die Infektion mit λ-Phagen oder zum Animpfen weiterer LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>-Kulturen eingesetzt werden.

### 2.2.2.2 Vorkulturen für die Infektion mit filamentösen Phagen

Ein geeigneter Stamm wird zunächst auf einer M9-Minimalplatte bei 37°C für 1-2 Tage angezogen. Danach wird von einer Einzelkolonie eine M9-Minimalflüssigkultur angeimpft und diese bei 37°C für 12-24h geschüttelt, sie ist bei 4°C für einige Tage stabil. Die Zellen dieser Vorkultur dienen zum Animpfen größerer LB/10mM MgSO<sub>4</sub>-Kulturen, die dann für die Infektion mit filamentösen Phagen eingesetzt werden.

M9-Minimalmedium:	2ml	10×M9-Salze (sterilisiert)
	200µl	20% (w/v) Glucose (sterilisiert)
	20µl	1M MgSO <sub>4</sub> (sterilisiert)
	2µl	1M CaCl <sub>2</sub> (sterilisiert, optional)
	5µl	4% (w/v) Thiamin (sterilfiltriert)
		ad 20ml ddH <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
M9-Minimalplatten:	2g	Bacto-Agar
	1ml	20% (w/v) Glucose
	200µl	1M MgSO <sub>4</sub>
		ad 80ml ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren und nach Abkühlung auf ca. 50°C 50µl 4% (w/v) Thiamin (sterilfiltriert) zugeben
10×M9-Salze:	60g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	30g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5g	NaCl
	10g	NH <sub>4</sub> Cl
		ad 1l ddH <sub>2</sub> O (pH7,4, NaOH)

### 2.2.3 Bakterienstämme

Zur Transfektion, Transformation, effizienter Gewinnung von Plasmid-DNA und Expression rekombinanter Proteine werden *Escherichia coli*, Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae (gramnegativ, fakultativ anaerob), verwendet. Dabei kommen für die verschiedenen Arbeitsschritte folgende Stämme, die alle Abkömmlinge des Stammes K12 sind, zum Einsatz:

**71/18**

Genotyp:  $\Delta(lac-proAB)$ , *thi-1*, *supE*, [F', *proAB*, *lacI<sup>q</sup>YZ* $\Delta$ M15]

Der Stamm produziert große Mengen des *lac*-Repressors (*lacI<sup>q</sup>*) und wird zur induzierbaren Expression von Genen, die unter Kontrolle des *lac*-Promotors stehen, genutzt. Durch die Deletion eines Teiles der  $\beta$ -Galaktosidasegene (*lacYZ* $\Delta$ M15) ist in Kombination mit Plasmiden, in denen  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine kloniert wurden (siehe 2.2.6.1), die Unterscheidung von Plasmiden mit und ohne *Insert* durch *Blue/White-Screening* in Gegenwart von IPTG (Substratanalogon von Laktose, das nicht verstoffwechselt werden kann, aber als effektiver Induktor wirkt) und X-Gal (chromogenes Substrat, das durch die enzymatische Aktivität ein gefärbtes Produkt ergibt und Bakterienkolonien blau wachsen läßt) möglich ( $\alpha$ -Komplementation). In dieser Arbeit wird der Stamm zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Anreicherung DNA-bindungsaktiver Proteine benutzt.

**DH5( $\alpha$ )**

Genotyp:  $\phi$ 80d, *lacZ* $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta(lacZYA-argF)$ , U169, F<sup>-</sup>

Als rekombinationsdefizienter (*recA1*) Stamm ist DH5( $\alpha$ ) insbesondere für die Isolierung von Plasmid-DNA hoher Qualität geeignet. Mit diesem Stamm ist die Untersuchung von Plasmiden mit klonierten DNA-Fragmenten durch *Blue/White-Screening* in Gegenwart von IPTG und X-Gal möglich. In dieser Arbeit wird er mit pBluescriptII SK<sup>+</sup>-Derivaten (siehe 2.2.6.1), die der *Closing Oligo*-Mutagenese (siehe 2.3.6.1.3) entstammen, transformiert.

**JM103**

Genotyp: *endA1*, *supE*, *sbcBC*, *thi-1*, *strA*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [F', *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>YZ*  $\Delta$ M15], (P1-lysogen), (*r<sub>K</sub><sup>+</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*)

Dieser Stamm wird wie 71/18 zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Anreicherung DNA-bindungsaktiver Proteine benutzt. Er exprimiert in hohem Maße den *lac*-Repressor (*lacI<sup>q</sup>*) und kann für *Blue/White-Screening*-Untersuchungen eingesetzt werden.

**LE392**

Genotyp: F<sup>-</sup>, *hsdR574* (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *supE44*, *supF58*, *lacY1* oder  $\Delta(lacIZY)6$ , *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*

LE392 wird zur Vermehrung von  $\lambda$ gt11-Phagen genutzt. Es handelt sich dabei um eine restriktionsnegative (*hsdR574*) Variante des Stammes ED8654, so daß DNA nicht durch das zelleigene Restriktionssystem abgebaut wird. Die *supF*-Mutation bewirkt eine Suppression der defekten Lyse des  $\lambda$ gt11-Phagen (siehe 2.2.6.2.1) und führt so zu einem verstärkten Auftreten lytischer Plaques in diesem Stamm.

**LK111( $\lambda$ )**

Genotyp: (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI<sup>q</sup>YZ* $\Delta$ M15, *Hfr*,  $\lambda$ <sup>+</sup>

Diese  $\lambda$ -lysogene Variante ( $\lambda$ <sup>+</sup>) des Stammes K12 exprimiert konstitutiv den  $\lambda$ -Repressor *cl* und reprimiert dadurch effizient durch den P<sub>L</sub>-Promotor kontrollierte Gene. In dieser Arbeit wird er

zur Gewinnung von Plasmid-DNA eingesetzt, jedoch ist in ihm auch die Vermehrung filamentöser Phagen möglich.

### GM1674

Genotyp: F' (PO65 von *Hfr*P804), F128-20, *pro*→*lac*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, Δ(*gpt-lac*)5, *supE*44, *galK*2, *galT*22, λ<sup>-</sup>, *dcm*-6, *dam*-3, *thi*-1

Wenn für Mutagenesen methylierungssensitive (*dam*- oder *dcm*-Methylierung) Restriktionsenzyme verwendet werden müssen, wird dieser methylierungsdefiziente (*dam*-3, *dcm*-6) Stamm zur Amplifikation nichtmethylierter Plasmid-DNA eingesetzt.

### RZ1032(λ)

Genotyp: *Hfr*K116, Po/45, Zdb-279::Tn10 (Tet<sup>R</sup>), [LysA(61-62)], *thi*-1, *relA*1, *spoT*1, *dut*-1, *ung*-1, λ<sup>+</sup>

Dieses Derivat des Stammes BW313 ist durch die Mutationen der Gene für dUTPase (*dut*-1) und Uracil-N-Glykosylase (*ung*-1) in der Lage, lediglich uracilhaltige DNA zu synthetisieren. Er wird für die Gewinnung von Plasmid-DNA eingesetzt, die in der *Closing oligo*-Mutagenese (siehe 2.3.6.1.3) verwendet wird. Weiterhin ist dieser Stamm für die Vermehrung filamentöser Phagen geeignet.

### TG1

Genotyp: F', *traD*36, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>/*supE*, Δ(*hsdM-mcrB*)5, (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup>*m*<sub>K</sub><sup>-</sup>), *mcrB*<sup>-</sup>, *thi*-1, Δ(*lac-proAB*)

In TG1-Zellen können Plasmide vermehrt werden, in denen *lacZ*(α)-Fusionsproteine kloniert wurden (*lacZ*ΔM15). Durch die konstitutive Überexpression des Repressors *lacI*<sup>q</sup>, ist eine effektive Kontrolle von *lac*-Promotor kontrollierten Genen auf *Multi copy number*-Plasmiden möglich.

### TGE900

Genotyp: (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup>*m*<sub>K</sub><sup>-</sup>), F', *su*-1, *ilv*-1, *bio*[λ*cl*857 Δ*Bam* Δ*HI*]

Dieser λ-lysogene Stamm wird zur Expression der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV* eingesetzt. Er exprimiert einen thermosensitiven λ-Repressor (λ*cl*857), der bei Temperaturen oberhalb von 37°C inaktiviert wird (Monomerbildung). Die Expression der toxischen Genprodukte wird verhindert, indem der Stamm zunächst bei 30°C angezogen wird (aktiver, dimerer λ-Repressor). Durch einfache Erhöhung der Temperatur im Inkubationsansatz auf 42°C wird die Expression von plasmidkodierten Genen, die unter der Kontrolle des P<sub>L</sub>-Promotors stehen, induziert. Zum Schutz der zelleigenen DNA während der Fermentation (siehe 2.2.12) der Restriktionsendonukleasen werden plasmidhaltige Zellen eingesetzt, die zusätzlich das jeweils zur Endonuklease korrespondierende Methylasegen (p*EcoR*4 für *EcoRI*, pLBM4422 für *EcoRV*, siehe 2.2.6.1) enthalten. Die erhebliche Toxizität der Genprodukte *EcoRI* beziehungsweise *EcoRV* kann auf diese Weise zumindest zum Teil durch Methylierung abgefangen werden, sodaß unter Methylaseschutz erhöhte Expression und größere Zellausbeuten zu erreichen sind.

**WK6mutS( $\lambda$ )**

Genotyp: ( $r_K^- m_K^+$ ),  $\Delta[lac\ proAB]$ ,  $galE$ ,  $strA$ ,  $mutS215$ : Tn10 [ $F'$ ,  $proAB$ ,  $lacI^q Z\Delta M15$ ],  $\lambda^+$

Dieser  $\lambda$ -lysogene ( $\lambda^+$ ) Stamm wird zur Vermehrung von *Mismatch*-Plasmiden aus der *Gapped duplex*-Methode (siehe 2.3.6.1.1) verwendet. Er ist durch Transposonmutagenese aus dem Stamm WK6 entstanden. Das für die *Mismatch*-Reparatur verantwortliche chromosomale *mutS*-Gen wurde hier durch Tn10 zerstört (*mutS215*: Tn10), so daß Basenfehlpaarungen durch diesen Stamm nicht korrigiert werden können.

**XL1-Blue**

Genotyp:  $recA1$ ,  $endA1$ ,  $gyrA96$ ,  $thi-1$ ,  $hsdR17$ ,  $supE44$ ,  $relA1$ ,  $lac$  [ $F'$ ,  $proAB$ ,  $lacI^q Z\Delta M15$ , Tn10 ( $Tet^R$ )]

XL1-Blue ist für die Vermehrung von Plasmid- und Phagen-DNA gleichermaßen geeignet. Das in ihm enthaltene  $F'$ -Episom (*Low copy number*-Plasmid, das auf dem Wege der sexuellen Konjugation zwischen verschiedenen Bakterien ausgetauscht werden kann,  $F$  für Fertilität) trägt die Gene, welche zur Ausbildung der  $F$ -Pili, über die der DNA-Transfer geschieht, führen. Über diese Pili können filamentöse Phagen Bakterienzellen infizieren (siehe 2.2.6.2.2). Die stabile Erhaltung des Plasmides wird durch Vermehrung der Zellen auf Minimalmedien erreicht, auf dem die ebenfalls auf dem  $F'$ -Episom vorhandenen Gene des Prolinstoffwechsels (*proAB*) für das Überleben notwendig sind. Trägt das  $F'$ -Plasmid ein Resistenzgen (Tn10( $Tet^R$ )), kann eine Haltung des Stammes auf Minimalmedium umgangen werden kann, da die Anwesenheit des Antibiotikums nur das Überleben von  $F^+$ -Zellen gestattet. In Kombination mit Plasmiden, in denen  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine kloniert wurden (siehe 2.2.6.1), ist in Gegenwart von IPTG und X-Gal *Blue/White-Screening* möglich ( $\alpha$ -Komplementation,  $lacI^q Z\Delta M15$ ).

**XL1-Blue MRF' Kan**

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ ,  $endA1$ ,  $supE44$ ,  $thi-1$ ,  $recA1$ ,  $gyrA96$ ,  $relA1$ ,  $lac$  [ $F'$ ,  $proAB$ ,  $lacI^q Z\Delta M15$ , Tn5( $Kan^R$ )]

Der Stamm ist wie XL1-Blue für die Vermehrung von Plasmid- und Phagen-DNA gleichermaßen geeignet. Das in ihm enthaltene  $F'$ -Episom trägt jedoch das Kanamycin-Resistenzgen (Tn5( $Kan^R$ )), das zur Selektion  $F'$ -plasmidhaltiger Zellen genutzt werden kann. Weiterhin sind alle K12-Restriktionssysteme deletiert worden ( $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ ).

**Y1089( $r^-$ )**

Genotyp:  $F'$ ,  $\Delta(lacU169)$ ,  $proA^+$ ,  $\Delta(lon)$ ,  $araD139$ ,  $strA$ ,  $hflA150$ , [ $chr::Tn10(Tet^R)$ ], (pMC9)

Y1089( $r^-$ ) wird zur Expression von  $lacZ(\alpha)$ -Fusionsproteinen im  $\lambda$ gt11-System genutzt. Dieses gelingt, weil eine Mutation im *hflA150*-Gen die Frequenz des Auftretens  $\lambda$ -lysogener Zellen erhöht. Zusätzlich wird durch die Deletion der ATP-abhängigen Protease La ( $\Delta(lon)$ ) der Abbau überexprimierter  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine unterdrückt. In diesen Bakterien akkumulieren Proteine in höherer Konzentration als in Wildtypzellen. Weiterhin enthalten die Zellen das Plasmid pMC9 (siehe 2.2.6.1), das konstitutiv den Repressor *lacI<sup>q</sup>* exprimiert.

**Y1089(r<sup>-</sup>)cur27**

Genotyp: Y1089(r<sup>-</sup>) plasmidkuriert (siehe 2.2.8.3) von pMC9

**Y1090(r<sup>-</sup>)**

Genotyp: F',  $\Delta(lacU169)$ ,  $proA^+$ ,  $\Delta(lon)$ ,  $araD139$ ,  $strA$ ,  $supF$ , [ $trpC22::Tn10(Tet^R)$ ], (pMC9),  $hsdR$  ( $r_k^- m_k^+$ )

Y1090(r<sup>-</sup>) wird zur Vermehrung von  $\lambda$ gt11-Phagen genutzt. Es handelt sich dabei um eine restriktionsnegative ( $r_k^-$ ) Variante des Stammes Y1090, so daß DNA nicht durch das zelleigene Restriktionssystem abgebaut wird. Die  $supF$ -Mutation bewirkt eine Suppression der defekten Lyse des  $\lambda$ gt11-Phagen (siehe 2.2.6.2.1) und führt so zu einem verstärkten Auftreten lytischer Plaques in diesem Stamm. Durch die  $lacU169$ -Deletion wird die Expression funktionaler endogener  $\beta$ -Galaktosidase verhindert. Auf diese Weise ist die Unterscheidung von rekombinanten Phagen und solchen ohne *Insert* möglich.  $\lambda$ -Phagen, die das intakte  $lacZ(\alpha)$ -Gen tragen, bilden im Gegensatz zu rekombinanten Phagen in Gegenwart von IPTG und X-Gal blaue Plaques aus.

**Y1090(r<sup>-</sup>)cur8**

Genotyp: Y1090(r<sup>-</sup>) plasmidkuriert (siehe 2.2.8.3) von pMC9

## 2.2.4 Aufbewahrung bakterieller Kulturen

**Flüssigkulturen** sind zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterien nicht geeignet, sie müssen nach einer Bebrütungsdauer von 12-24h entweder aufgearbeitet oder ein Teil der Kulturflüssigkeit in einen neuen Ansatz passagiert werden.

Kulturen auf **agarhaltigen Nährböden** können nach Versiegelung mit Parafilm bei 4°C für etwa 3-4 Wochen gelagert werden, danach wird eine Überimpfung auf frische Festmedien notwendig.

Die jahrelange, stabile Lagerung ist in **Glycerinkulturen** möglich, aus denen nach Bedarf Flüssig- oder Festmedien beimpft werden können.

Eine 3ml-LB-Kultur wird mit dem betreffenden Stamm beimpft und diese bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600nm} = 0,2-0,3$  (frühe logarithmische Phase) angezogen. 800 $\mu$ l der Bakteriensuspension werden entnommen und diese in einem Kryoröhrchen (Greiner, Nalgene) mit 200 $\mu$ l sterilem, 87%igem Glycerin gemischt. Die Mischung wird für 30min auf Eis gekühlt und danach bei -70°C gelagert.



## 2.2.5 Kompetente Zellen (*E.coli*)

Kompetente Zellen sind zur erleichterten Aufnahme von Plasmid-DNA aus ihrer Umgebung befähigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden nach verschiedenen Methoden präpariert.

### 2.2.5.1 TSS-Methode (*Transformation and storage in the same solution*)

Für einige Stämme wurde die TSS-Methode [Chung *et al.*, 1989] verwendet. Die bakteriellen Zellwände werden hierbei durch DMSO und ein Detergens vorgeschädigt sowie die negativen Ladungen der aufzunehmenden DNA durch  $Mg^{2+}$ -Ionen abgeschirmt. Die höchsten Transformationsraten (ca.  $1-5 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g superhelikale DNA für LK111( $\lambda$ ), für WK6mutS( $\lambda$ ) und TGE900 um etwa eine Größenordnung niedriger) ergeben sich bei DNA-Konzentrationen von 10pg-1ng pro Ansatz. Die erhaltene Kompetenz ist stammabhängig und nur über einen gewissen Zeitraum stabil (einige Wochen).

Der betreffende *E.coli*-Stamm wird in LB-Medium angezogen. Nach Erreichen einer  $OD_{600nm} = 0,3-0,5$  werden die Zellen schonend abzentrifugiert (1.000×g, 10min, 4°C) und in 1/10 des Kulturvolumens eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen werden zu 100 $\mu$ l aliquotiert, sie sind sofort kompetent und können transformiert oder in dieser Lösung schockgefroren (Trockeneis/Methanol oder flüssiger Stickstoff) und bei -70°C aufbewahrt werden .

TSS-Lösung:	10% (w/v)	PEG 3350 oder 8000
	5% (v/v)	DMSO
	20-50mg	MnCl <sub>2</sub> oder MgSO <sub>4</sub>
		in LB-Medium (pH6,5-6,8, NaOH)

### 2.2.5.2 Rubidiumchlorid-Methode

Eine Präparation kompetenter Zellen ist auch in Form einer modifizierten Methode nach Hanahan, bei der RbCl und CaCl<sub>2</sub> verwendet werden, möglich [Hanahan, 1983]. Im Vergleich zur TSS-Methode können hierbei für verschiedene Stämme um bis zu zwei Größenordnungen höhere Kompetenzen erreicht werden ( $>10^7$  cfu/ $\mu$ g eingesetzter DNA bei Verwendung von 0,1ng DNA pro Transformationsansatz). Die so erhaltenen Zellen sind bei -70°C für mindestens ein Jahr stabil.

Eine 100ml-Kultur des betreffenden *E.coli*-Stammes wird in LB/20mM MgSO<sub>4</sub> aus einer Vorkultur angeimpft und die Zellen für etwa 2-3h bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,4 - 0,6 angezogen. Die Zellen werden sedimentiert (1.300×g, 10min, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet vorsichtig in 100ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert und für 5min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte müssen auf Eis und mit gut gekühlten Gefäßen durchgeführt werden.

Die Zellen werden erneut sedimentiert (1.300×g, 10min, 4°C), der Überstand verworfen, die Zellen in 10ml eiskalter TFB2-Lösung vorsichtig resuspendiert und für 15-60min auf Eis aufbewahrt. Die kompetenten Zellen können transformiert oder zu 100µl aliquotiert und bei -70°C schockgefroren werden.

TFB1-Lösung:	30mM	KAc
	100mM	RbCl
	10mM	CaCl <sub>2</sub>
	50mM	MnCl <sub>2</sub>
	15% (w/v)	Glycerin

pH5,8 (0,1M HAc), die Lösung wird auf 410ml aufgefüllt, zu 100ml aliquotiert und autoklaviert

TFB2-Lösung:	10mM	MOPS
	10mM	RbCl
	75mM	CaCl <sub>2</sub>
	15% (w/v)	Glycerin

pH6,5 (0,1N KOH), die Lösung wird auf 150ml aufgefüllt, zu 10ml aliquotiert und autoklaviert

## 2.2.6 Vektoren

Vektoren dienen in Klonierungsexperimenten als Träger von Fremdgenen, wobei sie als eigenständige, vermehrungsfähige Einheiten fungieren, die in geeigneten Wirtszellen repliziert werden können.

### 2.2.6.1 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, autonom replizierende genetische Elemente vieler Bakterien. Natürlichlicherweise bestehen sie aus ringförmiger (kovalent geschlossener), doppelsträngiger DNA. Sie enthalten die genetische Information für Funktionen, die für die Lebensfähigkeit ihres Bakteriums nicht unbedingt erforderlich sind, wie Fertilitätsfaktoren, Resistenzen gegen Antibioti-

ka, Schwermetalle oder UV-Licht und Toxinproduktion (akzessorische Chromosomen). In Tab. 2.2 sind alle in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide im Vergleich aufgeführt.

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Ori	verw. Gene	ind. Prom.	Resistenzen
pACYC184	4.244	p15A	–	–	Chl, Tet
pBluescriptII	2.961	ColE1	<i>lacZ</i> ( $\alpha$ )	lac	Amp
pBR322	4.361	ColE1	–	–	Amp, Tet
pEcoR4	5.928	p15A	<i>ecoRI</i> -Meth.	–	Chl
pLBM4422	4.419	p15A	<i>ecoRV</i> -Meth.	–	Chl
pMC9	etwa 5.800	ColE1	<i>lacI</i>	–	Amp, Tet
pMunI Meth.	etwa 5.200	p15A	<i>munI</i> -Meth.	–	Chl
pRIF309+(CH <sub>6</sub> )	5.068	ColE1	<i>ecoRI</i> -CH <sub>6</sub>	$\lambda P_L$	Amp
pRK248	etwa 9.200	RK2	<i>cts857</i>	–	Tet
pRV03	5.047	ColE1	<i>ecoRV</i>	$\lambda P_L$	Amp
pUC8	etwa 2.700	ColE1	<i>lacZ</i> ( $\alpha$ )	–	Amp

ind. Prom.: induzierbarer Promotor; verw. Gene: verwendete Gene; Meth.: Methylase

### pACYC184

Bei diesem *Low copy number*-Plasmid (4244bp) handelt es sich um einen käuflich zu erwerbenden Vektor. Er trägt den p15A-Ori, was eine Koexistenz mit Plasmiden wie pBR322- oder pUC-Derivaten, die das ColE1-Replikon tragen, möglich macht. Das Chloramphenicol-Resistenzgen aus Tn9 und das Tetracyclin-Resistenzgen aus pSC101 können zur Selektion genutzt werden. In dieser Arbeit werden pACYC184-Derivate erzeugt, die modifizierte *lacZ*-Gene tragen.

### pBluescriptII SK+

Dieser kommerziell erhältliche Vektor ist ein pUC19-Derivat von 2961bp Größe. Er trägt den f1-Replikationsursprung, der die Synthese einer einzelsträngigen Kopie des *Sense*-Stranges des *lacZ*-Genes nach Superinfektion mit filamentösen Helferphagen ermöglicht. Das Plasmid wird als Klonierungsvektor verwendet, der nach Insertion von DNA-Fragmenten in die *Multicloningsite* des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments und anschließendem *Blue/White-Screening* in geeigneten Stämmen (*lacZ* $\Delta$ M15), die Selektion rekombinanter Phagemide erlaubt ( $\alpha$ -Komplementation). Der induzierbare *lac*-Promotor vor dem *lacZ*-Gen kontrolliert die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine. Das weiterhin enthaltene  $\beta$ -Lactamase-Gen verleiht den Zellen eine Ampicillin-Resistenz, die als Selektionsmarker genutzt wird. In dieser Arbeit werden verschiedene Varianten aus dem Ursprungsplasmid erstellt, die sich in der Sequenz der *Multicloningsite* und des *lac*-Promotor-Bereiches unterscheiden.

### **pBR322**

Das 4361bp große Plasmid besteht aus dem *Ori*- und *rop*-Gen-Anteil des ColE1-Derivates pMB1, dem Tetracyclin-Resistenzgen aus pSC101 und dem Ampicillin-Resistenzgen des Transposons Tn3, die als Selektionsmarker genutzt werden können. Es kann als genereller Klonierungsvektor verwendet werden. In dieser Arbeit dient das Plasmid als *Template* für eine PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten (siehe 2.3.7.6), die in Spaltexperimente (siehe 2.6.1) eingesetzt werden.

### **pEcoR4**

pEcoR4 (5929 bp) ist ein Abkömmling von pACYC184. Das Plasmid trägt dessen p15A-Replikon und ist zu pRIF309+(CH<sub>6</sub>) kompatibel. Es exprimiert konstitutiv die Chloramphenicol-acetyltransferase und die *EcoRI*-Methylase und erlaubt gemeinsam mit pRIF309+(CH<sub>6</sub>) die Überexpression der toxischen Restriktionsendonuklease *EcoRI* und ihrer Mutanten. Die Chloramphenicol-Resistenz wird als Selektionsmarker genutzt.

### **pLBM4422**

Dieses 4419pb große pACYC184-Derivat exprimiert ebenfalls konstitutiv die Chloramphenicol-acetyltransferase und die *EcoRV*-Methylase und erlaubt gemeinsam mit pRV03 die Überexpression der toxischen Restriktionsendonuklease *EcoRV* und ihrer Mutanten. Die Chloramphenicol-Resistenz wird als Selektionsmarker genutzt.

### **pMC9**

Bei pMC9 handelt es sich um ein pBR322-Derivat von etwa 5800bp Größe, welches das *lacI*-Gen trägt. Dieses kodiert für den *lac*-Repressor und erlaubt so die Regulation der Expression von Proteinen, die durch den *lac*-Promotor kontrolliert werden. Die Induktion der Proteinbiosynthese solch regulierter Gene wird durch die Zugabe von IPTG zum Medium erreicht. In dieser Arbeit ist der Vektor in Zellen enthalten, die für das  $\lambda$ gt11-Expressionssystem Anwendung finden. Er verleiht den Zellen eine Ampicillin-Resistenz.

### **pMunI Meth**

Wie pEcoR4 und pLBM4422 ist pMunI Meth ein pACYC184-Abkömmling von circa 5200bp Länge. Es exprimiert die zur *MunI*-Restriktionsendonuklease korrespondierende Methylase und ist zu ColE1-Derivaten kompatibel. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Virginius Siksnys (Institute of Biotechnology Fermentas, Vilnius, Litauen) zur Verfügung gestellt.

### **pRIF309+(CH<sub>6</sub>)**

Das in dieser Arbeit zur Mutagenese und Expression von wt*EcoRI* und *EcoRI*-Mutanten eingesetzte Plasmid ist pRIF309+(CH<sub>6</sub>) [Wolfes, 1986]. Dieser Phagemidvektor ist ein pBR322-Abkömmling mit einer Größe von 5068bp. Das Plasmid enthält sowohl den bakteriellen pMB1-Replikationsursprung ColE1 aus pBR322 zur Synthese einer doppelsträngigen Kopie, als auch den f1-Replikationsursprung, der die Synthese einer einzelsträngigen Kopie nach Superinfektion mit f1-Phagen ermöglicht. Das außerdem vorhandene  $\beta$ -Lactamase-Gen, das durch den Tn903-Tet<sup>R</sup>-

Promotor konstitutiv exprimiert wird, verleiht der Bakterienzelle eine Ampicillin-Resistenz, die als Selektionsmarker verwendet wird.

pRIF309+(CH<sub>6</sub>) enthält das jeweils modifizierte *ecoRI*-Gen, dem zur erleichterten Aufreinigung des Expressionsproduktes durch gentechnologische Methoden am C-Terminus des Proteines sechs Histidin-Reste (CH<sub>6</sub>) angehängt wurden [Rotzal, 1992], unter Kontrolle des P<sub>L</sub>-Promotors und des fd-Terminators. Bedingt durch die hohe Toxizität des Genproduktes kann das Plasmid nur in  $\lambda$ -lysogenen oder den  $\lambda$ -Repressor *cI* exprimierenden Stämmen gehalten werden. Die verwendete thermosensitive Repressormutante *d857* erlaubt in Verbindung mit dem P<sub>L</sub>-Promotor die Überexpression des Genproduktes durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30°C auf 42°C.

### pRK248

Durch die Verwendung dieses Plasmides (etwa 9200bp), das konstitutiv die thermosensitive  $\lambda$ -Repressormutante *d857* exprimiert, wird eine Expressionskontrolle von Genen, die durch den P<sub>L</sub>-Promotor reguliert werden, möglich. Da es den *RK2-Ori* enthält, ist eine gleichzeitige stabile Transformation von Bakterienzellen, die *ColE1*- und/oder *p15A*-Derivate enthalten, durchführbar. Zur Selektion kann die Tetracyclin-Resistenz herangezogen werden.

### pRV03

Das 5047bp große Plasmid entspricht pRIF309+(CH<sub>6</sub>), es enthält jedoch das *ecoRV*-Gen ohne zusätzliche Histidinreste. Es wurde gemeinsam mit pLBM4422 freundlicherweise von Frau Dr. Ursel Selent (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt.

### pUC8

pUC8 wird gewöhnlich als Klonierungsvektor verwendet, wobei es in seiner Verwendbarkeit die bereits für pBluescriptII SK+ beschriebenen Möglichkeiten bietet. Das Plasmid enthält innerhalb der *Multicloningsite* eine singuläre *EcoRI*-Schnittstelle, die zur Untersuchung der Aktivität von *EcoRI*-Mutanten in Spaltexperimenten (siehe 2.6.1) verwendet wird.

## 2.2.6.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen stellen natürliche Genvektoren dar. Sie sind in der Lage, Bakterienzellen effektiv zu transfizieren und deren Syntheseapparat unter Umständen vollkommen auf die Synthese der viruseigenen DNA, Enzyme und Hüllproteine umzustellen.

### 2.2.6.2.1 $\lambda$ -Phagen

Das Genom des Bakteriophagen  $\lambda$  besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül von etwa 50kbp Länge. Die DNA wird in Phagenpartikeln als lineares, doppelsträngiges Molekül mit einzelsträngigen (12 Nukleotide) komplementären Überhängen (*Cos sites*) verpackt. Die Adsorption der Phagen an Bakterienzellen erfolgt über das Maltosetransportprotein an deren Zelloberfläche. Bald

nachdem die DNA in das Wirtsbakterium eingedrungen ist, bildet sie durch Basenpaarung der kohäsiven Termini ein zirkuläres Molekül mit versetzten *Nicks*. Diese werden durch die wirtseigene DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das so entstandene zirkuläre DNA-Molekül dient als *Template* für die Transkription in der frühen Phase der Infektion.

Während dieser Phase können zwei verschiedene Wege der Replikation besprochen werden. Wächst der Phage lytisch, so wird die zirkuläre Virus-DNA vielfach repliziert, eine große Anzahl der Genprodukte des Bakteriophagen synthetisiert und neue Phagenpartikel assembliert. Unter Beteiligung zweier Phagenproteine kommt es zur Lyse der Zelle, die auf diese Weise eine große Anzahl infektiöser Phagenpartikel freisetzt. Wird dagegen das Virusgenom durch sequenzspezifische Rekombination in das Genom der Wirtszelle integriert, so liegt ein lysogenes Verhalten des Phagen vor. In diesem Zustand wird lediglich das *cI*-Gen, das den  $\lambda$ -Repressor kodiert, abgelesen.

### $\lambda$ gt11

Genotyp:  $\lambda$ lac5,  $\Delta$ shdIII $\lambda$ 2-3, srI $\lambda$ 3<sup>o</sup>, *cIts*857, srI $\lambda$ 4<sup>o</sup>, *nin*5, srI $\lambda$ 5<sup>o</sup>, Sam100

Dieser Vektor kann zur Konstruktion von cDNA und genomischen Bibliotheken eingesetzt werden [Huynh *et al.*, 1985]. Dabei können DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 7,2kbp in die *Eco*RI-Spaltstelle im *lacZ*( $\alpha$ )-Gen des Phagen integriert werden. So erzeugte Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Dieser wiederum wird zusätzlich durch den  $\lambda$ -Repressor kontrolliert. Durch die Unterbrechung des *lacZ*( $\alpha$ )-Genes können rekombinante Phagen in Gegenwart von IPTG und X-Gal durch die Bildung farbloser Plaques detektiert werden.

Für die Vermehrung des Phagen werden *supF*-Stämme verwendet. Der Bakteriophage trägt die Ambermutation Sam100, diese wird lediglich durch *supF*, nicht durch *supE*, unterdrückt. Im nicht-supprimierenden Stamm verhindert diese Mutation die Zellyse und erlaubt die intrazelluläre Akkumulation der Phagenpartikel und des Fusionsproteins.

In dieser Arbeit werden rekombinante  $\lambda$ gt11-Phagen mit kloniertem *ecoRI*-Gen erzeugt und für die anschließende Infektion von Bakterienzellen (siehe 2.2.2.1 und 2.2.3) verwendet.

#### 2.2.6.2.2 Filamentöse Phagen

Die filamentösen Bakteriophagen M13 [Hofschneider, 1963], f1 [Loeb, 1960; Zinder *et al.*, 1963] und fd [Marvin & Hoffmann-Berling, 1963] sind eng miteinander verwandt (98% identische Nukleotidsequenzen); sie tragen ein einzelsträngiges, kovalent geschlossenes DNA-Molekül von etwa 6,4kbp Länge. Die Phagen können lediglich spezifisch *E.coli*-Zellen infizieren, die das F<sup>+</sup>-Plasmid enthalten und die darauf kodierten Sexpili exprimieren. Am Adsorptionsprozeß sind einige wenige Moleküle eines kleinen Hüllproteines (GenIII-Produkt) beteiligt, die es dem Viruspartikel ermöglichen an das Ende eines Pilus zu binden. Die nach dem Eindringen der Virus-DNA beginnende Replikation resultiert zunächst in einer Akkumulation von 100-200 Molekülen doppelsträngiger RF-DNA (replikative Form). Anschließend wird nach dem Prinzip der *Rolling circle*-Replikation kontinuierlich der +-Einzelstrang synthetisiert und in die Virushülle verpackt.

Die Replikation filamentöser Phagen geschieht in Übereinstimmung mit dem sonstigen Bakterienhaushalt und führt daher nicht zur Zellyse; die entstandenen Viruspartikel werden aus der Zelle ausgeschleust. Dieses führt zu einer Anreicherung von Viruspartikeln im umgebenden Medium.

In dieser Arbeit werden filamentöse f1-Phagen zur Gewinnung einzelsträngiger DNA von Plasmiden, die den f1-*Ori* tragen, verwendet. Die gewonnene DNA wird für die *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.6.1.1) eingesetzt.

## 2.2.7 *In vitro*-Verpackung rekombinanter $\lambda$ -Phagen-DNA

Die *In vitro*-Verpackung von  $\lambda$ -Phagen-DNA benötigt den Zellextrakt eines phageninfizierten *E.coli*-Stammes, der alle für die Erstellung intakter Phagenpartikel notwendigen Proteine und Hüllenvorstufen bereitstellt. Komplette Verpackungsextrakte sind kommerziell erhältlich und wurden für diese Arbeit bei der Firma Promega (Packagene<sup>®</sup> Extract System) bezogen.

Der Verpackungsextrakt (50 $\mu$ l) wird im Eisbad aufgetaut. Anschließend werden 5-10 $\mu$ l (0,5-5 $\mu$ g DNA) eines entsprechenden Ligationsansatzes zupipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wird für 3h bei 22°C inkubiert. Danach werden 445 $\mu$ l Phagenpuffer und zur Sterilisation 25 $\mu$ l Chloroform zugegeben. Die Lösungen werden durch mehrfaches Kippen des Reaktionsgefäßes gemischt. Man läßt das Chloroform sich am Boden sammeln. Die so gewonnenen Phagen sind bei 4°C für einen Zeitraum von etwa sieben Tagen ohne Titerverlust stabil.

Für eine längerfristige Aufbewahrung werden dem Ansatz anstelle von Phagenpuffer 445 $\mu$ l S-Puffer und 25 $\mu$ l Chloroform zugesetzt. Der wässrige Überstand wird abgenommen und mit DMSO zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) versetzt. Der Extrakt ist auf diese Weise bei -70°C für den Zeitraum von etwa einem Jahr ohne Titerverlust stabil.

Phagenpuffer:	20mM	Tris/HCl pH7,4
	100mM	NaCl
	10mM	MgSO <sub>4</sub>
S-Puffer:	20mM	Tris/HCl pH7,4
	100mM	NaCl
	10mM	MgSO <sub>4</sub>
	2% (w/v)	Gelatine

## 2.2.8 Übertragung von Vektoren in Bakterienzellen und Plasmidkurierung

Klonierungs- und Expressionsvektoren müssen in geeignete Wirtszellen überführt werden. Plasmide werden dazu mit kompetenten Zellen zusammengebracht; diese nehmen die DNA aus ihrer Umgebung auf und werden dadurch stabil transformiert.  $\lambda$ -Phagen läßt man im Anschluß an ihre *In vitro*-Verpackung Zellen infizieren.

Auch eine Kurierung von Bakterienzellen, die ein Plasmid enthalten, ist möglich.

### 2.2.8.1 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmiden

Zur Transformation wird ein Aliquot von 100 $\mu$ l kompetenter Zellen (siehe 2.2.5) eingesetzt; dabei ist darauf zu achten, daß diese nicht über 4°C erwärmt werden. Die eben aufgetauten Zellen werden mit der Plasmid-DNA versetzt, bei 4°C inkubiert und nach Hitzeschock (Induktion von Reparaturenzym-Systemen) auf Selektivmedien vermehrt.

Ein 100 $\mu$ l-Aliquot kompetenter *E.coli*-Zellen wird im Eisbad aufgetaut, 10-100ng Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und die Zellen für weitere 45min im Eisbad belassen. Nach Hitzeschock (2min bei 42°C oder 2min bei 37°C, wenn die Zellen den thermosensitiven  $\lambda$ -Repressor enthalten) wird der Ansatz für weitere 2min im Eisbad aufbewahrt, danach 900 $\mu$ l LB-Medium zugegeben und die Zellen im Brutschrank (1h bei 37°C oder 30°C bei thermosensitivem  $\lambda$ -Repressor) angezogen.

Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen schonend sedimentiert (1.000 $\times$ g, 2min) und der Überstand weitestgehend dekantiert. Das Zellpellet wird im Restvolumen resuspendiert und auf vorbereiteten antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausplattiert. Diese werden über Nacht im Brutschrank (37°C oder 30°C bei thermosensitivem  $\lambda$ -Repressor) bebrütet. Um eine mögliche Kontamination der kompetenten Zellen festzustellen, wird ein Ansatz ohne Plasmid-Zusatz mitbebrütet.

Die erscheinenden Kolonien werden auf antibiotikahaltigen Nährböden vereinzelt und können nach 12-24h Bebrütungsdauer bei 37°C oder 30°C über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden (siehe 2.2.4).

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.1) werden von den vereinzelt Kolonien unter Antibiotikaschutz Flüssigkulturen angelegt, die nach einer Bebrütungszeit von 12-24h bei 37°C oder 30°C aufgearbeitet werden können.



### 2.2.8.2 Erzeugung $\lambda$ -lysogener Bakterienzellen

Zur Überprüfung der Funktionalität des *ecoRI*-Gens in rekombinanten  $\lambda$ -Phagen, werden lysogene Bakterienzellen erzeugt, in denen nachfolgend die Expression des Proteines möglich ist und dieses so auf seine Spaltaktivität untersucht werden kann.

Eine Übernachtskultur von Y1089(r<sup>-</sup>, pEcoR4) wird in LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>, nach Bestimmung der optischen Dichte (1OD<sub>600nm</sub> entspricht etwa 8×10<sup>8</sup> Zellen/ml), mit Anzuchtmedium so verdünnt, daß eine Dichte von 1×10<sup>8</sup> Zellen/ml erreicht wird. 10-100µl dieser Verdünnung werden mit einer Multiplizität von 5 des entsprechenden rekombinanten  $\lambda$ -Phagen versetzt und für 20min bei 32°C inkubiert. Der Ansatz wird mit LB/10mM MgSO<sub>4</sub> so verdünnt, daß bei einem ausplattierten Volumen von 100µl etwa 200 Klone zu erwarten sind. Die Verdünnung wird auf vorbereiteten LB-Platten ausgestrichen und bei 32°C (thermosensitiver  $\lambda$ -Repressor) bebrütet.

Auch eine direkte Erzeugung von lysogenen Zellen aus Phageneinzeleluaten (siehe 2.2.10.3) ist möglich. Dazu werden 10µl der verdünnten Bakterienzellen mit 100µl des Phageneluates versetzt, für 20min bei 32°C inkubiert, wie oben beschrieben verdünnt und ausplattiert.

20 Kolonien werden auf zwei LB/Chl-Platten vereinzelt. Eine dieser Platten wird bei 32°C, die andere bei 42°C inkubiert. Lysogene Zellen, die mit einer Frequenz von 10-70% auftreten, zeigen auf Grund der Inaktivierung des Repressors bei 42°C, kein oder nur sehr schlechtes Wachstum.

### 2.2.8.3 Plasmidkurierung von Bakterienzellen

Sollen Zellen von einem Plasmid kuriert werden, so werden diese in antibiotikumfreiem Medium angezogen und mehrfach in neue Kulturen passagiert. Die Zellen werden verdünnt, auf LB-Platten ausplattiert und auf ihre Antibiotikumempfindlichkeit untersucht.

Die zu kurierenden Zellen werden in LB-Medium angezogen und etwa alle 12h in frische Kulturen überimpft. Nach 3-5 Tagen werden mit LB-Medium Verdünnungen angefertigt, so daß 100µl etwa 1000 Zellen enthalten und je 100µl auf einigen LB-Platten ausgestrichen.

Die Platten werden bebrütet, bis die Kolonien etwa 1mm Durchmesser erreicht haben. Mit Hilfe eines Stempels (Accutran® Relica Plater, Schleicher&Schüll) werden die Kolonien auf antibiotikahaltige Platten überführt und diese bebrütet, bis die Kolonien gut zu erkennen sind. Durch Vergleich der Platten können die Zellen ermittelt werden, die über keine Antibiotika-Resistenz mehr verfügen.

## 2.2.9 Voruntersuchung rekombinanter $\lambda$ -Phagen

### 2.2.9.1 Transfektion von Bakterienzellen und Bestimmung des Phagentiters

Rekombinante  $\lambda$ -DNA wird *in vitro* zu infektiösen Partikeln verpackt (siehe 2.2.7), die anschließend Bakterien stabil transfizieren können. Die im folgenden beschriebene Methode kann weiterhin zur Bestimmung der Effizienz der Verpackung rekombinanter Phagen oder des Gehaltes einer phagenhaltigen Lösung an infektiösen Partikeln anhand des Phagentiters herangezogen werden.

Von der zu untersuchenden Phagensuspension werden mit Phagenpuffer geeignete Verdünnungen ( $1:10^3$ - $1:10^4$  für Verpackungsextrakte beziehungsweise  $1:10^9$ - $1:10^{13}$  für Eluate und Lysate) erstellt. 100  $\mu$ l der Phagenverdünnung werden mit 100  $\mu$ l einer geeigneten Bakterienvorkultur (siehe 2.2.2.1) in einem 6ml-Polypropylengefäß (Phagen adsorbieren stark an verschiedene Kunststoffe) versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Danach werden 3ml TB-Topagar (auf 45°C temperiert) zugegeben, durch mehrfaches Kippen gemischt und auf vorbereiteten LB-Platten (auf 37°C temperiert) ausgegossen. Man läßt den Agar aushärten und inkubiert die Platten über Nacht bei 37°C.

TB-Topagar:	1g	Pepton Nr.140
	0,5g	NaCl
	0,8g	Bacto-Agar
	1ml	1M MgSO <sub>4</sub>

Zur **Bestimmung des Titers** werden die Plaques für eine Verdünnung ausgezählt und nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Anzahl Plaques}) \times (\text{Verdünnungsfaktor}) / (\text{eingesetztes Volumen in ml}) = \text{pfu/ml}$$

Daraus kann für  $\lambda$ -Arme nach folgender Formel die **Verpackungseffizienz** bestimmt werden:

$$(\text{pfu/ml}) / (\text{Konz. der Vektor-DNA in } \mu\text{g/ml}) = \text{rekombinante Phagen}/\mu\text{g DNA}$$

### 2.2.9.2 Phageplaque-Lifting

Der Nachweis rekombinanter  $\lambda$ -Phagen wird in einer PCR-Reaktion (siehe 2.2.9.2) geführt. Dazu werden die Phagen mit Hilfe einer Nylonmembran (Hybond™-N (1×1 bis 2×2mm), Amersham), die für 15s auf einen gut isolierten Plaque aufgelegt wird, aus einem Einzelplaque

isoliert [Wang *et al.*, 1995] und sofort in einen vorpipettierten PCR-Ansatz (siehe 2.3.7.3) gegeben.

## 2.2.10 Präparation von Bakteriophagen

### 2.2.10.1 Plattenlysate

Um größere Mengen einer phagenhaltigen Lösung zu erhalten, können Bakteriophagen in Plattenlysaten vermehrt werden.

100µl einer geeigneten Bakterienvorkultur (siehe 2.2.2.1) werden in einem 6ml-Polypropylengefäß mit etwa  $1 \times 10^5$  pfu (gegebenenfalls Vorverdünnung in Phagenpuffer) des betreffenden Phagen bzw. 60-100µl Phageneinzeleluat (siehe 2.2.10.3) versetzt und für 20min bei 37°C inkubiert. Danach werden 2,5ml TB-Topagarose (auf 45°C temperiert; Agarose empfiehlt sich besonders dann, wenn aus dem Lysat anschließend Phagen-DNA isoliert werden soll, denn Agar enthält Substanzen, die Restriktionsendonukleasen hemmen können) zu den infizierten Zellen gegeben, durch mehrfaches Kippen gemischt und auf vorbereiteten LB-Platten (auf 37°C temperiert) ausgegossen. Man läßt die Agarose aushärten und inkubiert die Platten bei 37°C, bis die gebildeten Plaques einander berühren (6-12h).

Mit Hilfe eines Spatels wird die Topagarose von der LB-Unterlage abgenommen, in ein 50ml-Polypropylengefäß überführt und weitestgehend zerkleinert. Pro Platte werden 2-3ml SM-Puffer zugegeben und die Phagen unter Schütteln für 1-2h bei Raumtemperatur eluiert.

Agarosebruchstücke und Bakterienzellen werden sedimentiert (5.000×g, 15min, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Zur Sterilisation werden 0,3% (v/v) Chloroform zugeben. Daraus kann wie unter 2.3.1.3 beschrieben, Phagen-DNA gewonnen werden, oder die intakten Phagen werden für weitere Arbeiten eingesetzt.

Das Lysat ist bei 4°C ohne Titerverlust über mehrere Monate haltbar. Soll die Lösung langfristig gelagert werden, so wird ihr DMSO in einer Endkonzentration von 7% (v/v) zugesetzt. Auf diese Weise ist die jahrelange stabile Aufbewahrung bei -70°C möglich.

TB-Topagarose:	1g	Pepton Nr.140
	0,5g	NaCl
	0,6g	Agarose
	1ml	1M MgSO <sub>4</sub>

SM-Puffer:	50mM	Tris/HCl pH7,4
	100mM	NaCl
	8mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,01% (w/v)	Gelatine

Auf diese Weise werden sowohl nichtmethylierte  $\lambda$ -Phagen aus Y1090(r<sup>-</sup>) als auch methylierte  $\lambda$ -Phagen aus Y1090(r<sup>-</sup>, pEcoR4) erzeugt.

### 2.2.10.2 Flüssigkulturlysate

Bakteriophagen können auch in Flüssigkulturen vermehrt werden. Auf diese Weise sind leicht größere Mengen an phagenhaltigen Suspensionen zu erzielen, die jedoch in der Regel niedrigere Titer aufweisen als Phagenpräparationen aus Plattenlysaten.

Die Bakterienzellen einer geeigneten Vorkultur (siehe 2.2.2.1) werden mit einer Multiplizität von etwa 10 mit Phagen versetzt und für 5-6h bei 37°C kräftig geschüttelt. Die Kultur wird in sterile Polypropylengefäße überführt und die Zellen sedimentiert (5.000×g, 15min, 4°C). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und der Zentrifugationsschritt gegebenenfalls wiederholt. Zur Sterilisation werden 0,3% (v/v) Chloroform zugeben. Daraus kann wie unter 2.3.1.3 beschrieben Phagen-DNA gewonnen werden, oder die intakten Phagen werden für weitere Arbeiten eingesetzt.

Das so gewonnene Lysat ist bei 4°C ohne Titerverlust über mehrere Monate haltbar. Soll die Lösung langfristig gelagert werden, so wird ihr DMSO in einer Endkonzentration von 7% (v/v) zugesetzt. Auf diese Weise ist die jahrelange stabile Aufbewahrung bei -70°C möglich.

### 2.2.10.3 Gewinnung von Phagen aus einzelnen Plaques (Phageneinzel-eluate)

Die Gewinnung einzelner Spezies gelingt durch die Elution von Phagen aus isolierten Plaques.

Der gut isolierte Plaque wird mit Hilfe einer Pasteurpipette aus der Agarplatte ausgestochen und in 1ml SM-Puffer überführt. Nach Elution der Phagen für 1-2h bei RT (1ml Eluat enthält etwa  $10^6$ - $10^7$  infektiöse Phagenpartikel) kann die so gewonnene Lösung zur Vermehrung der Phagen in Platten- oder Flüssigkulturlysaten eingesetzt werden.

## 2.2.11 Charakterisierung rekombinanter $\lambda$ -Phagen

### 2.2.11.1 Überprüfung der Phagentoxizität

Die Toxizität rekombinanter  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.3.7.3) gegenüber Bakterienzellen wird wie im folgenden beschrieben überprüft.

Vorkulturen von zu testenden Bakterienstämmen werden in 20ml LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> über Nacht bebrütet. Davon werden neue 20ml-Kulturen angeimpft und bei 30°C bis zu einer Zelldichte von etwa OD<sub>600nm</sub> = 1 (entsprechend etwa 8×10<sup>8</sup> Zellen/ml) angezogen. Die Zellen werden mit LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> so verdünnt, daß eine Zelldichte von 4×10<sup>8</sup>Zellen/2ml erreicht wird.

Die Vorverdünnung wird mindestens mit dem 10fachen Überschuß an  $\lambda$ -Phagen versetzt und zur Infektion der Zellen für 20min auf 32°C temperiert. Ein entsprechender Ansatz ohne Phagenzusatz wird als Kontrolle ebenfalls untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für weitere 5min bei 42°C bebrütet (Inaktivierung des thermosensitiven  $\lambda$ -Repressors). Anschließend werden 100µl der Zellsuspension entnommen (Zeitwert: 0min) und wie unten beschrieben verdünnt. Nach Zugabe von 20µl IPTG (1M in ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) zur Inaktivierung des lac-Repressors, werden die Zellen für weitere 30, 60, 90 beziehungsweise 120min bei 38°C bebrütet, dabei werden die Zellen etwa alle 15min kräftig geschüttelt, um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

Danach werden wiederum 100µl der Zellsuspension entnommen und diese mit 900µl LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> verdünnt (2×10<sup>7</sup> Zellen/100µl bezogen auf die Ausgangszellzahl). In weiteren 1:10-Verdünnungsschritten werden die Zellen herunterverdünnt (2×10<sup>6</sup> bis 2×10<sup>2</sup> Zellen/100µl), um nach dem Ausplattieren auszählbare Koloniezahlen zu erhalten. Von den Verdünnungen 2×10<sup>4</sup>, 2×10<sup>3</sup> und 2×10<sup>2</sup> Zellen/100µl werden je 100µl auf vorbereiteten LB-Platten ausgestrichen, diese über Nacht bei 30°C inkubiert und die Kolonien ausgezählt.

### 2.2.11.2 Abwehr von $\lambda$ -Phagen durch Bakterienzellen

Die Abwehr von rekombinanten, toxischen  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.3.7.3) durch Bakterienzellen, die ein Plasmid mit induzierbarem Endonukleasegen tragen, wird wie folgt durchgeführt.

Vorkulturen in antibiotikahaltigen LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> werden bei 30°C über Nacht bebrütet. Daraus werden neue 20ml-Kulturen angeimpft und bei 30°C bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600nm</sub> = 1 (entsprechend etwa 8×10<sup>8</sup> Zellen/ml)

angezogen. Die Zellen werden mit LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>/Antibiotikum so verdünnt, daß eine Zelldichte von  $4 \times 10^8$  Zellen/2ml erreicht wird.

Der Vorverdünnung werden 1,9ml entnommen (Zeitwert: 0min) und auf 32°C temperiert, der Rest wird im Schüttelwasserbad bei 42°C zur Induktion der Restriktionsendonukleasegene für 5, 10 und 15min vorinkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden wiederum 1,9ml Zellsuspension entnommen, auf 32°C temperiert und mit 100µl LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> (ohne Phageninfektion als Kontrolle) oder zur Infektion mit 100µl (mindestens 10facher Überschuß) methylierten λgt11-Phagen (für die plasmidfreien und die „RI“-plasmidhaltigen Y1090(r<sup>-</sup>)) beziehungsweise mit nichtmethylierten Phagen für „RV“-plasmidhaltige Zellen auf 2ml aufgefüllt. Die Zellen werden für 20min bei 32°C, danach für 5min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 20µl IPTG (1M in ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) werden die Zellen für weitere 30min bei 38°C bebrütet.

Danach werden 100µl der Zellsuspension entnommen und diese mit 900µl LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub> verdünnt ( $2 \times 10^7$  Zellen/100µl bezogen auf die Ausgangszellzahl). In weiteren 1:10-Verdünnungsschritten werden die Zellen herunterverdünnt (entsprechend  $2 \times 10^6$  -  $2 \times 10^2$  Zellen/100µl), um nach dem Ausplattieren auszählbare Koloniezahlen zu erhalten. Von den Verdünnungen  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$  und  $2 \times 10^2$  Zellen/100µl werden je 100µl auf vorbereiteten LB/Antibiotika-Platten ausgestrichen, diese über Nacht bei 30°C inkubiert und die Kolonien ausgezählt.

### 2.2.11.3 Selektionstestsystem

Die Anreicherung von Zellen, die ein Plasmid enthalten, welches für eine spaltaktive Endonuklease kodiert, wird nach folgendem Ansatz versucht.

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 (pLBM4422, pRK248, pRV03: D90A) („D90A“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 (pLBM4422, pRK248, pRV03: wtEcoRV) („wtEcoRV“)

Die Zellen werden über Nacht in einer Vorkultur (LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>/Amp/Chl/Tet) bei 30°C angezogen. „D90A“-haltige Zellen werden in eine 1l-Kultur, „wtEcoRV“-haltige in eine 20ml-Kultur überimpft und diese bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} = 1$  im Schüttelwasserbad inkubiert. Ist diese Zelldichte erreicht, werden die Zellen mit Medium auf  $OD_{600nm} = 0,25$  ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml) verdünnt und in verschiedenen Verhältnissen („D90A“ : „wtEcoRV“) zusammengemischt:

1) $1,0 \times 10^2 : 1$	200ml „D90A“ + 2ml „wtEcoRV“
2) $5,0 \times 10^2 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 1)
3) $2,5 \times 10^3 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 2)
4) $1,3 \times 10^4 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 3)
5) $6,3 \times 10^4 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 4)
6) $3,1 \times 10^5 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 5)
7) $1,6 \times 10^6 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 6)
8) $7,8 \times 10^6 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 7)
9) $3,9 \times 10^7 : 1$	40ml „D90A“ + 10ml 8)

2ml jeder Verdünnung ( $4 \times 10^8$  Zellen) werden entnommen und auf  $32^\circ\text{C}$  temperiert. Zur Expression der Endonukleasen werden die Zellen für 15min bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert, danach 100 $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen und diese nach ihrer Verdünnung (siehe unten) mit Anzuchtmedium auf LB/Amp/Chl/Tet-Platten ausgestrichen, der Rest wird weiterhin auf  $32^\circ\text{C}$  temperiert. Zur Infektion wird mindestens der 10fache Überschuß rekombinanter Phagen ( $\lambda\text{P33}$ ) zugesetzt und der Ansatz für 20min bei  $32^\circ\text{C}$ , danach 5min bei  $42^\circ\text{C}$  und anschließend 30min bei  $38^\circ\text{C}$  inkubiert. Es werden 100 $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen, die Zellen im Anzuchtmedium verdünnt und ausplattiert. In einem zweiten Infektionszyklus werden erneut Phagen zugegeben und die Zellen wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Zur Verdünnung der entnommenen Zellsuspension wird diese zunächst mit 900 $\mu\text{l}$  LB/0,2% Maltose/10mM  $\text{MgSO}_4$  gemischt ( $2 \times 10^7$  Zellen/100 $\mu\text{l}$  bezogen auf die Ausgangszellzahl). In weiteren 1:10-Verdünnungsschritten werden die Zellen herunterverdünnt ( $2 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^3$  Zellen/100 $\mu\text{l}$ ), um nach dem Ausplattieren auszählbare Koloniezahlen zu erhalten. Von den Verdünnungen, die  $2 \times 10^4$  und  $2 \times 10^3$  Zellen/100 $\mu\text{l}$  enthalten, werden je 100 $\mu\text{l}$  auf vorbereiteten LB/Antibiotika-Platten ausgestrichen, diese über Nacht bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert und die Kolonien ausgezählt.

## 2.2.12 Proteinexpression

### 2.2.12.1 Expression von *EcoRI*-Mutanten in kleinem Maßstab (Induktionsversuch)

Um die erfolgreiche Expression von *EcoRI*-Mutanten durch den Stamm TGE900(pEcoR4) zu überprüfen, werden diese zunächst in kleinem Maßstab kultiviert.

3ml-Kulturen werden unter Antibiotikaschutz angeimpft und die Zellen über Nacht bei  $30^\circ\text{C}$  angezogen. Aus den angelegten Flüssigkulturen werden durch Überimpfen von 100 $\mu\text{l}$  Kulturmedium neue 3ml-Kulturen angelegt und diese für 3-4h bei  $30^\circ\text{C}$  be-

brütet. Danach wird 1ml der Bakteriensuspension entnommen, während der Rest des Ansatzes für weitere 2h bei 42°C inkubiert wird. Nach Ablauf dieser Zeit wird wiederum 1ml entnommen und die Proben wie folgt aufgearbeitet.

Die Zellen werden sedimentiert (13.000×g, 2min, 4°C), der Überstand verworfen, das Sediment in 100-200µl Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert, für 5min auf 95°C erhitzt und danach auf Eis abgeschreckt. 10-20µl des so gewonnenen Zellysates werden auf ein 17,5%iges Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch getrennt. Der Rest der Zellen kann sedimentiert, in 0,5ml PDL/0,3M NaCl aufgenommen und einer Untersuchung auf Spaltaktivität im Rohaufschluß (siehe 2.6.1.2) unterzogen werden.

PDL-Puffer:            30mM     $KP_i$   
                               100mM    DTE  
                               0,01% (v/v)    Lubrol

### 2.2.12.2 Expression von *EcoRI*-Mutanten im 100ml- bis 500ml-Maßstab

Die Gewinnung kleinerer Proteinmengen wird durch Anzucht von TGE900(pEcoR4), die die jeweiligen *EcoRI*-Mutanten enthalten, im 100ml- bis 500ml-Maßstab durchgeführt.

Eine entsprechende LB/Amp/Chl-Kultur wird mit 10ml einer Vorkultur des entsprechenden Expressionsstammes TGE900(pEcoR4) angeimpft und bei 30°C bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600nm} = 2$  angezogen. Die Induktion der Proteinsynthese erfolgt durch Anhebung der Inkubationstemperatur auf 42°C für 2h.

Die Zellen werden sedimentiert (5.000×g, 15min, 4°C), in 10ml ST-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und das Zellpellet bis zu seiner weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

ST-Puffer:            10mM    Tris/HCl pH8,0  
                               100mM    NaCl

### 2.2.12.3 Expression von *EcoRI*-Mutanten im 10l-Maßstab

Um *EcoRI*-Mutanten in großem Maßstab zu gewinnen, werden diese im 10l-Fermenter angezogen.

Der Fermenter wird komplett zusammengebaut, mit 8l entionisiertem Wasser befüllt und über Nacht bei 120°C sterilisiert. Man läßt ihn auf Raumtemperatur abkühlen und schließt die Luftversorgung und den Thermostaten an. Dem Inhalt



werden ein Liter 10fach-LB-Medium, 1g Ampicillin, 0,3g Chloramphenicol und etwa 2-3ml Entschäumer (Extran 31, Merck) zugemischt. Danach wird mit einer 500ml-Vorkultur der betreffenden Mutante in TGE900(pEcoR4) angeimpft und die Zellen bis zu einer Dichte von  $OD_{600nm} = 2$  bei 30°C angezogen, wobei regelmäßig eine pH-Kontrolle erfolgt (pH 7,5).

Ist diese Zelldichte erreicht, werden 500ml sterile Glucose-Lösung (200g/l) und 500ml sterile Caseinhydrolysat-Lösung (200g/l) zugefügt und die Proteinbiosynthese durch Anhebung der Temperatur auf 42°C induziert. Nach zwei Stunden können die Zellen geerntet werden. Der Fermenterinhalt wird auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (5.000×g, 10min, 4°C). Das Zellpellet wird in 200ml ST-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen werden in 50ml PDL/0,5M NaCl aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.12.4 Expression von *EcoRV*

Die mögliche Abwehr von  $\lambda$ -Phagen durch Bakterienzellen soll mit einem Testsystem (siehe 2.2.11.3), das zum einen das *EcoRV*-Wildtypenzym zum anderen die spaltinaktive, aber bindungsaktive *EcoRV*-Mutante D90A beinhaltet, überprüft werden.

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 (pLBM4422, pRK248, pRV03: D90A) („D90A“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 (pLBM4422, pRK248, pRV03: wt*EcoRV*) („wt*EcoRV*“)

Die Zellen werden über Nacht in einer Vorkultur (LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>/Antibiotika) bei 30°C angezogen. Diese werden in frische 20ml-Kulturen (LB/0,2% Maltose/10mM MgSO<sub>4</sub>/Antibiotika) überimpft und bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} = 0,5-1$  im Schüttelwasserbad inkubiert. Ist diese Zelldichte erreicht, werden die Zellen mit Medium auf  $OD_{600nm} = 0,25$  verdünnt (50ml-Maßstab).

Es werden 4×2ml jeder Verdünnung entnommen (2ml-Reaktionsgefäße) und im Thermoblock für 15min bei 32°C temperiert. Zur Untersuchung der Expression der Endonukleasen werden die Zellen für 0, 5, 10 beziehungsweise 15min bei 42°C (Thermoblock), danach wiederum für 15min bei 32°C inkubiert (entsprechend den Bedingungen, die auch für eine Infektion mit  $\lambda$ gt11-Phagen gewählt werden).

100 $\mu$ l der Zellsuspension werden entnommen und diese nach ihrer Verdünnung (siehe unten) mit Anzuchtmedium auf LB/Antibiotika-Platten ausplattiert. Die verbleibenden 1,9ml der Zellen plasmidfreier Y1090(r<sup>-</sup>)cur8-Zellen beziehungsweise „D90A“ werden verworfen. Die Zellen, welche wt*EcoRV* exprimieren,

werden unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit sedimentiert (13.000×g, 2min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus diesen wird die Spaltaktivität nach Rohaufschluß bestimmt (siehe 2.6.1.2).

### 2.2.12.5 Expression von *EcoRI* durch $\lambda$ -lysogene Zellen

Die Funktionalität des *ecoRI*-Gens in rekombinanten  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.3.7.3) wird durch die Expression des Proteines durch lysogene Y1089(r<sup>-</sup>, pEcoR4) (siehe 2.2.6.1) überprüft.

Eine LB/Amp/Chl-Kultur wird mit dem entsprechenden Stamm beimpft und bei 32°C und guter Sauerstoffversorgung angezogen. Ist eine Zelldichte von  $OD_{600nm} = 0,5$  erreicht, wird die Inkubationstemperatur möglichst schnell auf 42-45°C angehoben und die Kultur für 20min bei dieser Temperatur geschüttelt.

Zur Induktion der Proteinexpression wird IPTG in einer Endkonzentration von 10mM zugegeben, die Kultur in ein Schüttelwasserbad von 37-38°C überführt und für ca. 60min inkubiert (die Temperatur soll nicht unter 37°C fallen).

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen unverzüglich sedimentiert (3.000×g, 5min, 24-37°C) und in 1/20-1/50 des Originalvolumens mit PDL/0,3M NaCl aufgenommen. Zur Überprüfung der Induktion wird ein Aliquot der Zellsuspension mit 50µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 5min auf 95°C erhitzt. Nach Abschrecken auf Eis werden 10-20µl des so gewonnenen Zellysates auf ein 17,5%iges Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch getrennt. Der Rest der Zellen wird einer Aktivitätsbestimmung nach Rohaufschluß (siehe 2.6.1.2) unterzogen.

### 2.2.12.6 Expression von *EcoRI* durch Bakterienzellen, die gleichzeitig das *lacZ*( $\alpha$ )-System enthalten

Eine dem *lac*-Repressor entsprechende Wirkung auf die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit (siehe 3.2.2) kann auch durch andere DNA-bindende Proteine bewirkt werden, sofern im transkriptionellen Kontrollbereich des Gens entsprechende Bindungsstellen vorhanden sind. Um die Funktionalität des Selektionssystems zur Anreicherung von Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität (siehe 1.8.3.2) nachzuweisen, sollen verschiedene spaltinaktive *EcoRI*-Mutanten verwendet werden. Im *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereich vorhandene GAATTC-Sequenzen können von diesen besetzt werden und als Pseudorepressoren wirken. Für diesen Ansatz werden verschiedene Bakterienstämme verwendet, die *Blue/White-Screening* erlauben (siehe 2.2.3) und die Plasmide pACYClacZRI, pRK248 und pRIF309+ (*EcoRI*-Wildtypenzym, E111A, D91A) enthalten (siehe 2.2.6.1).

Die Zellen werden in einer LB/Chl/Tet/Amp-Vorkultur bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} \cong 0,5$  angezogen. Anschließend werden diese mit Medium so verdünnt, daß 100µl etwa 500 Zellen enthalten.

Je 100µl jeder Verdünnung werden auf vorbereiteten LB/Antibiotika-Platten, die zuvor mit IPTG und X-Gal beschichtet werden, ausplattiert und bei 30°C (Kontrolle) oder zur Induktion der Endonukleasegene im Temperaturbereich zwischen 37-42°C über Nacht inkubiert. Die gebildeten Kolonien werden auf die Intensität der Färbung untersucht und mit jener des Kontrollansatzes verglichen. Insbesondere bei einer Bebrütungstemperatur von 30°C zeigen die Kolonien nach der Inkubation häufig keine deutliche Blaufärbung. Eine anschließende Aufbewahrung der Platten für einige Stunden bei 4°C fördert die Blaufärbung.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Gewinnung von DNA

#### 2.3.1.1 Gewinnung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten für die verschiedenen Mutageneseansätze und die Überprüfung des Mutageneseerfolges setzt eine Reinsolierung der zu untersuchenden Plasmid-DNA voraus. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden stellen Kombinationen einer alkalischen Extraktionsmethode [Birnboim & Doly, 1979] mit anschließender Säulenchromatographie dar. Dadurch ist eine einfache Abtrennung von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen möglich.

Die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis zu 20µg) aus 1-5ml Kulturvolumen erfolgt nach einem Standardprotokoll der Firma Qiagen mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits. Dabei kommen Minispinsäulen mit einer Silicagelmatrix zum Einsatz, die in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen DNA zu binden vermag. Plasmid-DNA aus 100-500ml Kulturvolumen wird ebenfalls nach einem Standardprotokoll der Firma Qiagen unter Verwendung einer Ionenaustauschmatrix in tip100- oder tip500-Säulen durchgeführt. Die gewonnene DNA wird jeweils in 100µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer:	10mM	Tris/HCl pH8,0
	1mM	EDTA

### 2.3.1.2 Gewinnung einzelsträngiger Plasmid-DNA

Einzelsträngige DNA von Plasmiden nach Infektion von Bakterienzellen mit filamentösen Phagen (siehe 2.2.6.2) wird je nach Kulturvolumen ebenfalls nach Standardprotokollen der Firma Qiagen durchgeführt. Die Isolierung von bis zu 10µg ssDNA erfolgt mit dem QIAprep Spin M13 Kit. Für größere DNA-Mengen kommen tip500-Säulen zum Einsatz.

### 2.3.1.3 Gewinnung von $\lambda$ -DNA

Die Isolierung von  $\lambda$ -DNA aus Flüssigkulturüberständen (siehe 2.2.10.2) oder Plattenlysaten (siehe 2.2.10.1) geschieht nach einem Standardprotokoll der Firma Qiagen. Unter Verwendung von tip20- oder tip100-Säulen für 10-50ml Ausgangsvolumen ist so die Isolierung von 12-60µg DNA möglich. Weiterhin wird der Nucleobond Kit L der Firma Macherey&Nagel gemäß der Herstellervorschrift verwendet. Bei Einsatz von 0,5 bis 2,5g der Extraktionsmatrix ist eine maximale Ausbeute von 12-60µg  $\lambda$ -DNA bei 10-50ml Ausgangsvolumen möglich.

### 2.3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von Herrn Dr. H. Wolfes (Zentrum Biochemie, Medizinische Hochschule, Hannover) nach dem  $\beta$ -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Verfahren mit einem Cyclone-DNA-Synthesizer Biosearch 8600 (Millipore) oder einem DNA-Synthesizer Oligo-1000/M (Beckmann Instruments) im 0,2-1µmol-Maßstab hergestellt [Wolfes, 1985]. Die Synthese erfolgt dabei an fester Phase (*Controlled pore glass beads*) in 3'→5'-Richtung, wobei der erste Baustein über einen alkalilabilen *Spacer* an das Säulenmaterial gekoppelt ist.

Nach Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägermaterial und Entschützung der exozyklischen Aminosäuren der Basen, wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und der trockene Rückstand in TE aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach Verdünnung in TE spektroskopisch (siehe 2.3.2.3). Die Überprüfung der Präparationen auf kürzere Abbruchprodukte, die der Synthese entstammen, erfolgt durch *Shadow casting*-Gele (siehe 2.3.2.2.2). Gegebenenfalls werden die Oligonukleotide aus diesen präparativ aufgearbeitet.

Synthetische Oligonukleotide werden für Mutagenesen, Sequenzierungen und als PCR-*Primer* eingesetzt. Ihre jeweilige Sequenz wird an entsprechender Stelle vermerkt.

## 2.3.2 DNA-Analytik

### 2.3.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten erfolgt in Agarosegelen (Qualex Gold Agarose, AGS), die besonders zur Auftrennung relativ hochmolekularer DNA-Moleküle (mehr als 500bp) geeignet ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist dabei annähernd dem Logarithmus des Molekulargewichts proportional. Je nach Größe des zu untersuchenden Fragmentes werden hier 0,8%ige bis 1,5%ige Agarosegele verwendet.

Die benötigte Agarosemenge wird in 100ml TPE-Puffer (1fach) aufgenommen und in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, wird sie in eine horizontale Elektrophoresekassette (20×10×0,5cm) geben. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird die Kassette mit TPE gefüllt. Für analytische Trennungen werden bis zu 20µl Probe aufgetragen. Die präparative Trennung von Restriktionsfragmenten erfolgt in größerem Maßstab mit bis zu 50µg DNA in maximal 250µl Probenvolumen. Die Elektrophorese wird bei konstant 60V und 100mA durchgeführt, wobei der Puffer zur gleichmäßigen Verteilung der Ladungsträger ständig umgepumpt wird.

TPE-Puffer (10fach):	0,9M	Tris
	20mM	EDTA
		pH8,2
		(einstellen mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )

Agarosegel-Auftragspuffer (5fach):	250mM	EDTA
	1,2% (w/v)	SDS
	25% (w/v)	Saccharose
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	0,1% (w/v)	Xylen Cyanol FF

Der Nachweis der DNA und eine Konzentrationsbestimmung anhand eines Standards erfolgt durch anschließende Anfärbung mit Ethidiumbromid und Zuordnung der Banden unter UV-Licht (312nm).

Ethidiumbromid lagert sich bevorzugt zwischen zwei aufeinanderfolgenden G:C-Paaren ein (Interkalation), wodurch die Struktur der DNA verändert wird. Mit der reversiblen Einlagerung in DNA erhöht sich die Fluoreszenz des Interkalators um etwa das 50fache. Dieser Fluoreszenzanstieg ermöglicht die semiquantitative Bestimmung einer unbekanntes DNA-Konzentration (Nachweisgrenze etwa 1ng).

Die Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) wird ca. 1:10.000 mit warmem Wasser verdünnt ( $\approx 0,5\mu\text{g/ml}$  Färbelösung) und das Gel für etwa 15min bei  $60^\circ\text{C}$  (Wärmeschrank) gefärbt. Die Entfärbung erfolgt für weitere 15min mit warmem Wasser. Die Fluoreszenz wird durch UV-Licht bei 312nm auf einem UV-Transilluminator (Chema 4, Bachhofer) sichtbar gemacht und durch das E.A.S.Y-Video-dokumentationssystem (Herolab) fixiert. Die Bilder können sowohl als Thermoausdruck wie auch als Bilddatei dokumentiert werden, was eine weitere Analyse mit der zugehörigen E.A.S.Y-Software möglich macht.

Für präparative Zwecke werden die entsprechenden DNA-Banden aus dem Gel ausgestochen und aus der Matrix (siehe 2.3.4.1) isoliert.

### 2.3.2.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Untersuchung und Aufreinigung kleinerer DNA-Fragmente und Oligonukleotide erfolgt mit Hilfe von Polyacrylamidgelen.

#### 2.3.2.2.1 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Analyse von DNA-Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten werden vertikale 5%ige bis 10%igen native Polyacrylamidgele ( $90\times 65\times 1\text{mm}$ ) in  $1\times\text{TTE}$ -Puffer verwendet. Vor dem Probenauftrag werden diese mit mindestens ein Fünftel des Volumens mit PAA-Auftragspuffer versetzt und anschließend bei konstant 30mA getrennt. Die Anfärbung des Geles erfolgt auf der unterliegenden Glasplatte mit Ethidiumbromid, die Dokumentation der Ergebnisse wird wie unter 2.3.2.1 beschrieben durchgeführt.

Dient die Elektrophorese präparativen Zwecken, so wird das Gel in Haushaltsfolie eingeschlagen, die betreffenden Banden unter UV-Licht (254nm) gekennzeichnet und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der darin enthaltenen DNA geschieht wie unter 2.3.4.2 beschrieben.

TTE-Puffer (20fach):	1,8M	Tris
	575mM	Taurin
	2,7mM	EDTA
		pH $\cong$ 9 (nicht nachstellen)

PAA-Auftragspuffer:	10mM	Tris/HCl pH8,0
	1mM	EDTA
	50% (v/v)	Glycerin
	0,2% (w/v)	Azorubin
	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
	0,2% (w/v)	Xylen Cyanol FF

### 2.3.2.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (*Shadow casting*-Gel)

Synthetische Oligonukleotide werden je nach ihrer Länge mit Hilfe von vertikalen 12-20%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen (90×65×1mm) in 1×TTE-Puffer auf ihre korrekte Größe und kürzere Abbruchprodukte, die der Synthese entstammen, untersucht. Das fertige Gel wird zunächst einem 30minütigen Vorlauf bei konstant 30mA unterworfen, wobei es sich auf etwa 50-60°C erwärmt. Je 0,25-5 OD<sub>260nm</sub> (siehe 2.3.1.4) der Proben werden mit mindestens 1/5tel des Volumens an *Shadow casting*-Auftragspuffer versetzt, 5min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und bei konstant 30mA getrennt. Nach Abschluß der Elektrophorese wird das Gel auf eine folienumhüllte Kieselgel-DC-Platte mit Fluoreszenzindikator (KG 60 F254; Merck) gelegt und die Banden unter UV-Licht (Universal-UV-Lampe, Camag) bei 254nm indirekt sichtbar gemacht. Die bei dieser Wellenlänge auftretende Absorption des Lichtes durch die DNA bedingt einen Schattenschwurf (*Shadow casting*), der als solcher durch die DC-Platte sichtbar gemacht werden kann.

Sollen Oligonukleotide auf diese Art und Weise präparativ aufgereinigt werden, werden die Banden ausgeschnitten und wie unter 2.3.4.2 beschrieben eluiert.

<i>Shadow casting</i> -Auftragspuffer:	89,5% (v/v)	Formamid
	0,5% (w/v)	Azorubin
		in 1×TTE

### 2.3.2.3 UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen erfolgt durch Aufnahme eines Spektrums in einem Wellenlängenbereich zwischen 220-320nm. Bei Oligonukleotiden wird deren Extinktionskoeffizient additiv aus den Koeffizienten ( $\epsilon_{260nm}$ ) der einzelnen Nukleotide berechnet. Als Extinktionskoeffizienten für die einzelnen Basen werden folgende Zahlenwerte verwendet:

$\epsilon_{260nm}$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]:	A	15.158
	G	11.616
	T	8.500
	C	7.345

Aus den ermittelten Werten wird mit Hilfe des Programmes PRIMKONZ (freundlicherweise programmiert und zur Verfügung gestellt von Herrn Jürgen Bullmann, Hannover) der DNA-Gehalt berechnet.

Für die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA werden die folgenden, allgemein verwendeten, spektroskopischen Umrechnungen [Sambrook *et al.*, 1989] eingesetzt:

1OD<sub>260nm</sub> dsDNA: 50µg/ml  
 1OD<sub>260nm</sub> ssDNA: 30µg/ml  
 mittleres MW für ein Desoxyribonukleotid-Basenpaar: 660g/mol  
 mittleres MW für eine Desoxyribonukleotid-Base: 330g/mol

## 2.3.3 Enzymatische DNA-Modifikationen

### 2.3.3.1 Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide

Sollen Oligonukleotide als Mutageneseprimer verwendet werden, so ist eine vorherige Phosphorylierung ihrer 5'-Enden notwendig.

20pmol des Oligonukleotids werden mit 2µl Standardpuffer (10fach), 2µl 0,1M DTT, 1µl 10mM ATP und 1µl T4 Polynukleotid-Kinase (PNK, 10U/µl) versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O ad 20µl aufgefüllt und 30-60min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes für 2min auf 95°C gestoppt (Inaktivierung der PNK) und auf Eis abgeschreckt. Die Ansätze können bei -20°C gelagert werden.

Standardpuffer (10fach):	200mM	Tris/HCl pH7,5
	500mM	NaCl
	100mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.3.3.2 Restriktionsspaltung

Für die Erzeugung von Mutageneserahmen und *-Inserts*, zur Anreicherung positiver Klone aus den verschiedenen Mutagenesemethoden (siehe 2.3.6) und zur Überprüfung der Spaltbarkeit von PCR-Produkten, wird die DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Enzyme werden entsprechend den Herstellerangaben im mitgelieferten Reaktionspuffer eingesetzt und die erhaltenen Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.2.1) getrennt oder unter Verwendung des QIAquick Spin Kits (siehe 2.3.4.3) aufgereinigt.



Bei **analytischen Spaltungen** werden 0,5-1µg Plasmid-DNA beziehungsweise 5µl PCR-Ansatz mit 1µl 10fach-Spaltpuffer und jeweils 2-10U der Restriktionsendonuklease versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O ad 10µl aufgefüllt und für 1h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5µl Agarose-Auftragspuffer oder Hitzeinaktivierung des Enzyms, soweit diese möglich ist, gestoppt.

Für **präparative Spaltungen** werden etwa 8-10µg Plasmid-DNA beziehungsweise 30µl PCR-Ansatz eingesetzt und mit 15-20U der Restriktionsendonukleasen im entsprechend vergrößerten Reaktionsansatz bei der optimalen Reaktionstemperatur für 3-4h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.3.3.3 *Fill in*-Reaktionen

#### 2.3.3.3.1 *Fill in*-Reaktionen zur Erzeugung von *Blunt end*-DNA-Fragmenten

Um eine Ligation von Restriktionsfragmenten zu ermöglichen, die nicht über kompatible Enden verfügen, werden diese durch den Einsatz von nativer *Pfu*-Polymerase (Stratagene) oder T4 DNA-Polymerase (Fermentas) in ihre *Blunt end*-Form überführt.

Bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase werden 0,2-0,5µg der DNA mit 2µl Reaktionspuffer (Stratagene, 10fach) und 8µl 2,5mM dNTPs mit ddH<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt und mit 0,5U nativer *Pfu*-Polymerase versetzt. Der Ansatz wird für 30-60min bei 68°C inkubiert.

Wird T4 DNA-Polymerase für die *Fill in*-Reaktion verwendet, werden ebenfalls 0,2-0,5µg der DNA mit 2µl Reaktionspuffer (Fermentas, 10fach) und 1µl 2mM dNTPs mit ddH<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt und mit 1U T4 DNA-Polymerase versetzt. Der Ansatz wird für 30min bei 16°C inkubiert und das Enzym anschließend bei 75°C inaktiviert.

Die so gewonnene DNA wird direkt in nachfolgende Ligationen (siehe 2.3.3.4) eingesetzt.

#### 2.3.3.3.2 Hybridisierung und *Fill in*-Reaktionen für Mutagenesen

Die Teile des Mutageneserahmens (verkürzter pRIF309+(CH<sub>6</sub>)-Doppelstrang), die einzelsträngige pRIF309+(CH<sub>6</sub>)-Matrize und die Oligonukleotide werden nach den dargestellten Methoden gewonnen und vorbehandelt.

10pmol phosphoryliertes Oligonukleotid werden in Hybridisierungspuffer gemeinsam mit 1pmol sspRIF309+(CH<sub>6</sub>) und 0,5pmol verkürztem Doppelstrang im Thermoblock für 5min bei 95°C denaturiert. Danach wird dieser ausgeschaltet und die Probe langsam auf RT heruntergekühlt. Der Ansatz kann bei -20°C gelagert oder sofort in einer anschließenden *Fill in*-Reaktion weiter verarbeitet werden.

Hybridisierungspuffer:	100mM	Tris/HCl pH7,5
	1,5M	KCl

Müssen in Mutageneseansätzen nach einer Hybridisierung der DNA-Einzelkomponenten verbleibende einzelsträngige Bereiche aufgefüllt werden, so geschieht dieses unter Verwendung von T7 DNA-Polymerase (siehe 2.3.3.3.2). Der gleichzeitige Einsatz von T4 DNA-Ligase ist dabei möglich.

Zum Hybridisierungsansatz werden je 7,5U T7 DNA-Polymerase und T4 DNA-Ligase und 8µl 10×*Fill in*-Puffer pipettiert und ad 80µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 5min auf Eis, danach 1h bei Raumtemperatur inkubiert, für 10min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Der Ansatz kann bei -20°C gelagert werden.

<i>Fill in</i> -Puffer:	275mM	Tris/HCl pH9,5
	675mM	KCl
	150mM	MgCl <sub>2</sub>
	20mM	DTE
	0,5mM	ATP
	0,25mM	dNTPs

### 2.3.3.4 Ligation von DNA

Neben der Spaltung definierter DNA-Sequenzen durch Restriktionsendonukleasen ist die enzymatische Neuverknüpfung von DNA-Stücken ein weiterer entscheidender Prozeß in der Gentechnologie. Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird unter Verwendung von T4 DNA-Ligase erreicht, sie wird nach den jeweiligen Herstellerangaben in der Regel im zugehörigen Reaktionspuffer verwendet. Die eingesetzten DNA-Mengen können je nach Applikation variieren und werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

## 2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten

Im Anschluß an Restriktionsspaltungen (siehe 2.3.3.2), der elektrophoretischen Auftrennung von Oligonukleotiden und PCR-Reaktionen, kann eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen oder wässriger Lösung nötig werden.

### 2.3.4.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Schnelle Methoden der Aufreinigung von linearer DNA aus Agarose stellt die Firma Qiagen zur Verfügung, wobei zum einen eine dosierbare Silica-Partikel-Variante (QIAEX I und II) zum anderen ein Minisäulen-Kit (QIAquick) verwendet werden kann. Beide Methoden werden jeweils nach den Herstellervorschriften angewandt.

### 2.3.4.2 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen

Für die Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen wird das isolierte Gelstück gründlich zerkleinert, mit einer ausreichenden Menge an TE-Puffer versetzt und unter Schütteln über Nacht bei RT eluiert. Sofern es sich um ein natives Polyacrylamidgel handelt, kann die so gewonnene DNA direkt weiter verarbeitet werden. Entammt das Gelstück einer denaturierenden Auftrennung (*Shadow casting*-Gel), so wird das Eluat zur Entfernung des Harnstoffs gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert.

### 2.3.4.3 Isolierung von DNA aus wässrigen Lösungen

Wenn keine vorhergehende elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten notwendig ist (PCR-Ansätze und einige Restriktionsspaltungen), wird die darin enthaltene DNA entweder durch klassische Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahren oder durch den Einsatz des QIAquick PCR Purification Kits, der in Analogie zum bereits beschriebenen Gel Extraction Kit (siehe 2.3.4.1) gemäß den Herstellerangaben verwendet wird, eingesetzt.

## 2.3.5 Erzeugung rekombinanter $\lambda$ -Phagen

Aus einem mit Hilfe einer PCR-Reaktion amplifizierten DNA-Fragment (siehe 2.3.6.2), wird unter Verwendung der darin enthaltenen *EcoRI*-Schnittstellen (siehe 2.3.3.2), das *ecoRI*-Gen isoliert. Um innerhalb der  $\lambda$ -Phagen das richtige Leseraster zu erzeugen, wird das isolierte Gen zunächst mit kurzen, synthetischen *Linkern* (siehe Tab. 2.3) versehen. Diese werden nach ihrer Phosphorylierung (siehe 2.3.3.1) mit dem Gen ligiert (siehe 2.3.3.4), wobei die ursprünglichen *EcoRI*-Schnitt-

stellen zerstört und an für die nachfolgende Klonierung geeigneter Position neu generiert werden. Das *ecoRI/Linker*-Fragment wird mit *EcoRI* gespalten und nach Hitzeinaktivierung des Enzymes direkt in eine nachfolgende Ligation mit  $\lambda$ gt11/*EcoRI*-Armen (Promega) eingesetzt.

Tab. 2.3: Sequenzen der Oligonukleotide, die als *Linker* für die Erzeugung rekombinanter  $\lambda$ -Phagen verwendet werden

<i>gt11 Linker forward</i>	GGGAATTCGA
<i>gt11 Linker reverse</i>	AATTTCGAATTCCC

Günstige molare Konzentrationsverhältnisse für eine erfolgreiche Ligation von  $\lambda$ gt11-Armen mit einem *Insert* bewegen sich im Bereich zwischen 0,25:1 bis 8:1 [Sambrook *et al.*, 1989] und müssen für jeden Klonierungsansatz optimiert werden. In dieser Arbeit wird für einen Ligationsansatz 1  $\mu$ g  $\lambda$ gt11-DNA (0,035 pmol) verwendet und im molaren Verhältnis von 1:2 oder 1:5 mit dem *ecoRI/Linker*-Fragment in einem Ansatz, dessen Gesamtvolumen nicht größer als 15  $\mu$ l sein soll, ligiert.

10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes werden nach Ablauf der Reaktionszeit (15°C, 20h) und Hitzeinaktivierung der Ligase in eine *In vitro*-Verpackung (siehe 2.2.7) eingesetzt.

## 2.3.6 Mutagenese-Strategien

### 2.3.6.1 Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der im folgenden aufgeführten zielgerichteten Mutagenese-Methoden werden verschiedene *EcoRI*-Mutanten hergestellt, sowie Veränderungen des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereichs von pBluescriptII SK+ (siehe 2.2.6.1) vorgenommen.

#### 2.3.6.1.1 Gapped duplex-Mutagenese

Für die zielgerichtete Herstellung von *EcoRI*-Mutanten wird in dieser Arbeit die *Gapped duplex*-Methode [Kramer *et al.*, 1984] verwendet. Die jeweilige Mutation wird dabei durch ein synthetisches Oligonukleotid (siehe 2.3.1.4) eingeführt. Sofern es sich dabei um Mutationen in der Aminosäuresequenz des Proteines handelt, führt dieses eine neben dem zu verändernden Aminosäurecodon eine weitere Mutation ein, die eine singuläre Restriktionsschnittstelle erzeugt oder zerstört. Die gegebene Aminosäuresequenz wird dadurch an dieser Stelle nicht beeinflusst („stille“ Mutation), erlaubt jedoch die Selektion gegen das Wildtypplasmid (Abb. 2.1).

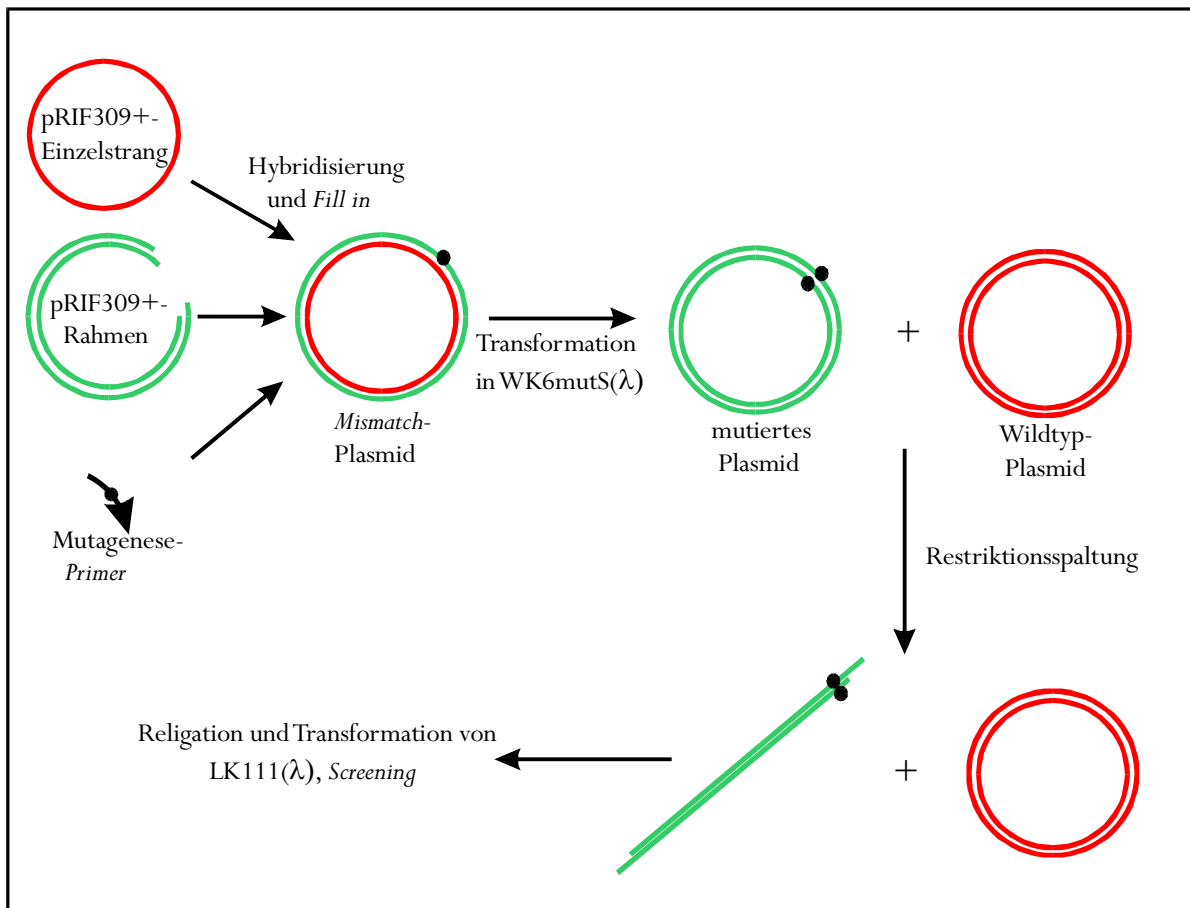


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der *Gapped duplex*-Mutagenese

Das mutagene Oligonukleotid wird gemeinsam mit einem Vektorfragment, dem der zu mutierende Bereich fehlt (*Gap*), auf einen einzelsträngigen Matrizenstrang hybridisiert (Heteroduplex-Bildung). Die verbleibenden Lücken in dem jetzt größtenteils doppelsträngigen Plasmid werden durch T7 DNA-Polymerase aufgefüllt und durch T4 DNA-Ligase kovalent geschlossen (siehe 2.3.3.3.2). Mit der gebildeten Heteroduplex werden reparaturdefiziente *WK6mutS*( $\lambda$ )-Zellen transformiert (siehe 2.2.3). Die Anreicherung positiver Klone ist möglich, indem isolierte Plasmid-DNA nach einem Restriktionsverdau entweder nur die noch ungeschnittenen Plasmide (bei Zerstörung einer Restriktionsschnittstelle) oder die linearisierten Plasmide (bei Einführung einer Restriktionsschnittstelle), die anschließend religiert werden, enthält. Zur effizienten Vermehrung der so gewonnenen Plasmide werden mit diesen *LK111*( $\lambda$ ) transformiert (siehe 2.2.8.1).

Durch die Hybridisierungsreaktion, die das Auffüllen großer einzelsträngiger Bereiche und so Kettenabbrüche in Sekundärstrukturen von ssDNA vermeidet, bleibt der größte Teil des mutierten Stranges physiologisch modifiziert erhalten. Dieses führt durch die erschwerte Unterscheidungsmöglichkeit veränderter/unveränderter Strang zu geringerer Effektivität des *Mismatch*-Reparatursystems. Unter diesen Bedingungen sind Mutagenese-Ausbeuten bis zu 50% möglich. Die Anreicherung erfolgreich mutierter Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau erhöht die Ausbeute.

Mit Hilfe der *Gapped duplex*-Mutagenese werden Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erzeugt. Zum einen werden über stille Mutationen Schnittstellen für die Endonukleasen *MunI* und *EcoRV* eingeführt (Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Oligonukleotide siehe Tab. 2.4), ohne daß die Aminosäuresequenz und damit die Spaltaktivität des Genproduktes beeinflusst wird. Dieses

veränderte *ecoRI*-Gen soll in nachfolgenden Schritten in  $\lambda$ -Phagen integriert werden und so die Toxizität der Phagen erhöhen (siehe 2.2.6.2.1).

Tab. 2.4: Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Erzeugung von Schnittstellen für *EcoRV* und *MunI* im *ecoRI*-Gen in der *Gapped duplex*-Mutagenese eingesetzt werden, im Vergleich zur Wildtypsequenz

wt-Sequenz	CAA	TTA	TCA	TTT	CGA	TAT	AGA	GAT	AGT	ATA	AAG	AAA	ACA
<i>EcoRV</i> 467			CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	GAT	AGT	ATA			
								<i>EcoRV</i>					
wt-Sequenz	GAA	GCC	AAA	CAC	CAA	GGT	AAA	GAT	ATT	ATA	AAT	ATA	AGG
<i>EcoRV</i> 652 ( <i>Sty ex</i> )	GAA	GCC	AAA	<u>CAT</u>	<u>CAA</u>	<u>GGT</u>	AAA	<u>GAT</u>	<u>ATC</u>	ATA	AAT	ATA	AGG
				<i>StyI</i>				<i>EcoRV</i>					
wt-Sequenz	CGA	AGC	ATT	GGA	ATT	CTA	GAT	GGA	TTC	ATG	TCT	AAT	AAA
<i>MunI</i> 291		GC	ATT	GGA	<u>ATT</u>	<u>CCA</u>	<u>ATT</u>	<u>GGA</u>	TTC	ATG	TC		
					<del>ATT</del>	<i>MunI</i>							
wt-Sequenz	AAC	GAA	TAC	CCT	CAA	TTA	TCA	TTT	CGA	TAT	AGA	GAT	AGT
<i>MunI</i> 454			C	CCT	<u>CAA</u>	<u>TTG</u>	TCA	TTT	CGA				
					<i>MunI</i>								
wt-Sequenz	ATG	GCT	GCT	GGT	AAT	GCT	ATT	GAA	AGA	TCT	CAT	AAG	AAT
<i>MunI</i> 725			GCT	GGT	AAT	<u>GCA</u>	<u>ATT</u>	<u>GAA</u>	AGA	TCT	C		
						<i>MunI</i>							

● im Vergleich zum pRIF309+(CH6) (wt) veränderte Base; Unterstreichung: eingeführte oder entfernte Schnittstelle

Weiterhin werden verschiedene Mutanten der Aminosäurepositionen Asp59, Asp91 und Glu111 erzeugt (siehe Tab. 2.6), die nach Expression und Aufreinigung der Proteine charakterisiert werden (siehe 2.6). Die Sequenzen der eingesetzten synthetischen Oligonukleotide im Vergleich zur Wildtypsequenz sind in Tab. 2.5 dargestellt.

Tab. 2.5: Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Erzeugung von *EcoRI*-Mutanten der Aminosäurepositionen Asp59, Asp91 und Glu111 in der *Gapped duplex*-Methode eingesetzt werden, im Vergleich zur Wildtypsequenzen

wt-Sequenz														59		
	CAA	TTA	TCA	TTT	CGA	TAT	AGA	<i>GAT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	ACA	Asp		
				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GCT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Ala	
				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GAG</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Glu	
				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GGT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Gly	
D59A				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GCT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Ala	
D59E				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GAG</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Glu	
D59G				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>GGT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Gly	
D59N				CA	TTT	<u>CGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CGA</u>	<i>AAT</i>	AGT	ATA	AAG	AAA	AC	Ala	
<hr/>																
wt-Sequenz														91		
	TCA	AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	CCT	<i>GAT</i>	GGT	GGA	ATT	GTA	GAG	Asp		
				CC	AGC	ATC	AAA	<u>CCC</u>	<i>CAT</i>	<u>GGT</u>	GGA	ATT			His	
				CA	AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	<u>CCA</u>	<i>TGT</i>	<u>GGT</u>	<u>GGA</u>	ATT	GTA	GAG
				AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	<u>CCA</u>	<i>CGT</i>	<u>GGT</u>	GGA	ATT	GTA	G	Arg
D91H				CC	AGC	ATC	AAA	<u>CCC</u>	<i>CAT</i>	<u>GGT</u>	GGA	ATT			His	
D91C				CA	AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	<u>CCA</u>	<i>TGT</i>	<u>GGT</u>	<u>GGA</u>	ATT	GTA	GAG
D91R				AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	<u>CCA</u>	<i>CGT</i>	<u>GGT</u>	GGA	ATT	GTA	G	Arg
<hr/>																
wt-Sequenz														111		
	TGG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	GCT	<i>GA</i>	GCC	AAA	CAC	CAA	GGT	Glu		
				GTA	CTT	GTT	<u>GCG</u>	<i>CAT</i>	<u>GCC</u>	AAA	CAC	C			His	
				GG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	<u>GCA</u>	<i>TGC</i>	GCC	AAA	CAC	AAA	GG
				GG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	<u>GCG</u>	<i>CGC</i>	GCC	AAA	CAC	CAA	G
E111H				GTA	CTT	GTT	<u>GCG</u>	<i>CAT</i>	<u>GCC</u>	AAA	CAC	C			His	
E111C				GG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	<u>GCA</u>	<i>TGC</i>	GCC	AAA	CAC	AAA	GG
E111R				GG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	<u>GCG</u>	<i>CGC</i>	GCC	AAA	CAC	CAA	G

• mutierte Aminosäure (kursiv); • im Vergleich zum wt veränderte Base; Unterstreichung: eingeführte Schnittstelle

### 2.3.6.1.2 Closing oligo-Mutagenese

Im Gegensatz zur *Gapped duplex*-Mutagenese wird bei dieser Methode doppelsträngige, uracilhaltige Plasmid-DNA eingesetzt (Abb. 2.2). Neben dem eigentlichen Mutageneseoligonukleotid wird ein zweites, sogenanntes *Closing oligo*, verwendet [Slilaty *et al.*, 1990], das selbst keine Mutation trägt. Es dient dazu, die freien Enden eines der beiden Stränge des linearisierten Plasmides zu schließen und so zu rezirkularisieren (Heteroduplexbildung). Im nachfolgenden *Fill in*- und Ligationsschritt dient das *Closing oligo* als *Primer* für T7 DNA-Polymerase. Die Verwendung uracilhaltiger DNA als *Template* aus RZ1032( $\lambda$ )-Zellen (siehe 2.2.3) erlaubt anschließend eine selektive Replikation (theoretische Mutationshäufigkeit 50%), denn in Gegenwart von dUTPase (*dut*) und Uracil-N-Glykosylase (*ung*) wird die Replikation uracilhaltiger DNA gehemmt. Auf diese Weise können nach der *In vitro*-Synthese des komplementären, uracilfreien Stranges und anschließender Transformation eines *dut*<sup>+</sup> *ung*<sup>+</sup>-Stammes, mutierte Plasmide angereichert werden.

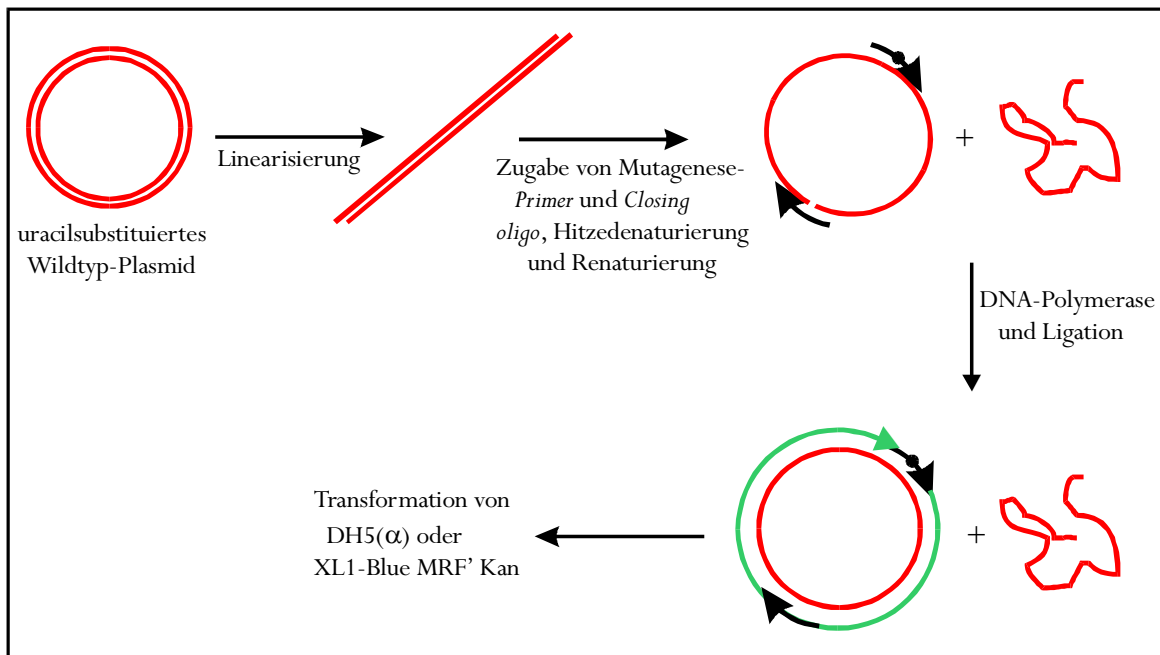


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der *Closing oligo*-Mutagenese

Mit der *Closing oligo*-Methode werden pBluescriptII SK<sup>+</sup>-Derivate erzeugt, die im Bereich des *lac*-Promotors auf dessen 5'-Seite Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bbs*I tragen, was eine spätere Kassetten-Mutagenese erlaubt (siehe 2.3.6.2). Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 2.7 verzeichnet.



Tab. 2.7: Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Erzeugung einer Schnittstelle für *Bbs*I auf der 5'-Seite des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotors in pBSK+ $\Delta$ NE in der *Closing oligo*-Mutagenese eingesetzt werden, im Vergleich zur Ausgangssequenz (wt)

wt-Sequenz	CCA	CAC	AAC	ATA	CGA	GCC	GGA	AGC	ATA	AAG	TGT	AAA	GCC
<i>lacZ</i> 5' <i>Bbs</i>	CCA	CAC	AAC	ATA	CGA	<u>TCC</u>	<u>GGA</u>	<u>AGA</u>	<u>CTA</u>	AAG	TGT	AAA	GCC
						<i>Acc</i> III	<i>Bbs</i> I						
<i>Closing Oligo</i>	CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT CAT TC												

● im Vergleich zu pBluescriptII SK+ $\Delta$ NE (wt) veränderte Base; Unterstreichung: eingeführte Schnittstelle

### 2.3.6.1.3 Quik change-Mutagenese

Mit Hilfe des Quik Change<sup>TM</sup>-Mutagenese Kits (Stratagene) können unter Verwendung doppelsträngiger DNA zielgerichtet Punktmutationen, einzelne Aminosäureaustausche sowie größere Deletionen oder Insertionen erzeugt werden. Zusätzlich zur superhelikalen, doppelsträngigen Plasmid-DNA werden bei dieser Methode zwei synthetische, komplementäre Oligonukleotide, die die einzuführende Mutation tragen, benötigt (Abb. 2.3). Diese fungieren als *Primer* für native *Pfu*-Polymerase und werden in einer PCR von 12-18 Zyklen verlängert. Als Produkt entsteht so ein doppelsträngiges Plasmid, das in jedem Strang einen zueinander versetzten *Nick* trägt. Dieses wird direkt im Anschluß an die PCR mit *Dpn*I behandelt. Die Restriktionsendonuklease *Dpn*I spaltet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA in der Sequenz G<sup>me6</sup>ATC und ermöglicht auf diese Weise den Abbau der eingesetzten und eine Anreicherung der mutierten DNA. Die dargestellte Methode soll für jedes Plasmid anwendbar sein und eine Mutationsfrequenz von mehr als 80% erlauben [Papworth *et al.*, 1996].

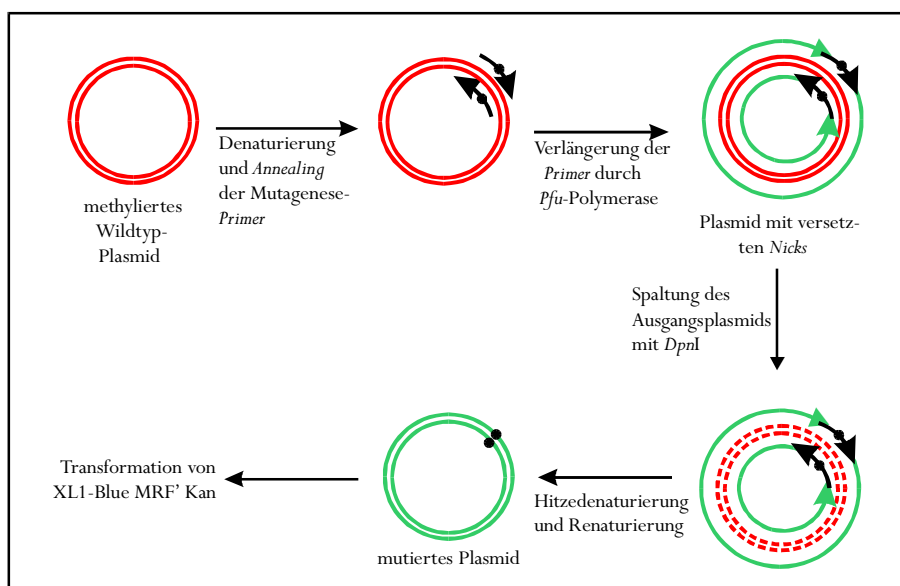


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der *Quik change*-Mutagenese

Mit der *Quik change*-Methode werden in dieser Arbeit pBluescriptII SK<sup>+</sup>-Derivate erzeugt, die im Bereich des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotors auf dessen 3'-Seite eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BbsI* tragen, die eine spätere Kassetten-Mutagenese erlaubt (siehe 2.3.6.2). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 2.8 verzeichnet. Bezüglich des *Primerdesigns* sei an dieser Stelle auf das Herstellerhandbuch verwiesen, die Aufreinigung erfolgt wie unter 2.3.2.2.2 beschrieben.

Tab. 2.8: Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Erzeugung einer Schnittstelle für *BbsI* auf der 3'-Seite des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotors in pB SK<sup>+</sup> $\Delta$ NE in der *Quik change*-Mutagenese eingesetzt werden, im Vergleich zur Ausgangssequenz (wt)

wt-Sequenz	GTT	TCC	TGT	GTG	AAA	TTG	TTA	TCC	GCT	CAC	AAT	TCC	ACA
<i>lacZ</i> 3' <i>Bbs</i> <i>hin</i>		CC	TGT	GTG	AAA	TTG	<u>TCT</u>	<u>TCC</u>	GCT	CAC	AAT	TCC	
						<i>BbsI</i>							
wt-Sequenz	CAA	AGG	ACA	CAC	TTT	AAC	AAT	AGG	CGA	GTG	TTA	AGG	TCT
<i>lacZ</i> 3' <i>Bbs</i> <i>rück</i>		GG	ACA	CAC	TTT	AAC	<u>AGA</u>	<u>AGG</u>	CGA	GTG	TTA	AGG	
						<i>BbsI</i>							

● im Vergleich zu pBSK<sup>+</sup> $\Delta$ NE (wt) veränderte Base; Unterstreichung: eingeführte Schnittstelle

### 2.3.6.2 Kassetten-Mutagenese

Das aus der gezielten Mutagenese (siehe 2.3.6.1) gewonnene pBluescriptII SK<sup>+</sup>-Derivat mit auf beiden Seiten von einer *BbsI*-Schnittstelle flankiertem *lacZ*( $\alpha$ )-Promotor (pBSK+3',5'Bbs; Abstand der *BbsI*-Schnittstellen: 50 Basen) wird mit Hilfe einer anschließenden Kassetten-Mutagenese weiter modifiziert. Dazu werden die entsprechenden Plasmide mit *BbsI* präparativ gespalten (siehe 2.3.3.2), das Fragment nach elektrophoretischer Trennung isoliert (siehe 2.3.4.1) und anschließend mit einer synthetischen Oligonukleotid-Kassette ligiert (siehe 2.3.3.4). Durch die Kassette werden die *BbsI*-Schnittstellen zerstört und in diesem Bereich die Wildtypsequenz regeneriert, gleichzeitig werden zwei *EcoRI*-Schnittstellen eingeführt, die den eigentlichen Promotor direkt flankieren. Sie sollen in nachfolgenden Untersuchungen als Bindungsstellen fungieren, die bei einer Besetzung durch *EcoRI*-Proteine, welche als Pseudorepressoren wirken, die Ablesung des nachfolgenden *lacZ*( $\alpha$ )-Genes verhindern. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tab. 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Sequenzen der Oligonukleotide, die als Kasette in den *lacZ*( $\alpha$ )-Promotor gesetzt werden, im Vergleich zur Ausgangssequenz

3'5'Bbs hin-Sequenz	CTG TGT GAA ATT <b>GTC TTC</b> CGC TCA CAA TTC CAC ACA ACA <i>BbsI</i>
	TAC GAT CCG <b>GAA GAC</b> TAA AGT GTA AAG CCT GGG GTG TAA <i>AccIII BbsI</i>
<i>EcoRI</i> hin	GAA ATT <b>GTT ATC</b> CGC TCA CAA <b>TGA ATT CCA</b> ACA <i>BbsI EcoRI</i>
	TAC <b>GAA TTC</b> GAA <b>GCC</b> TA <i>AccIII BbsI EcoRI</i>
3'5'Bbs rück-Seq.	AGG CAC CCC AGG CTT TAC ACT TTA <b>GTC TTC</b> CGG ATC GTA <i>BbsI AccIII</i>
	TGT TGT GTG GAA TTG TGA GCG <b>GAA GAC</b> AAT TTC ACA GGA <i>BbsI</i>
<i>EcoRI</i> rück	ACT TTA <b>TGC TTC GAA TTC</b> GTA <i>BbsI AccIII EcoRI</i>
	TGT <b>TGG AAT TCA</b> TTG TGA GCG <b>GAT AAC</b> AA <i>EcoRI BbsI</i>

● im Vergleich zu pBSK+ $\Delta$ NE 3'5' Bbs veränderte Base; Unterstreichung: eingeführte oder entfernte Schnittstelle

## 2.3.7 Thermostabile DNA-Polymerasen und ihre Verwendung

Thermostabile DNA-Polymerasen werden in dieser Arbeit für diverse Anwendungen eingesetzt. Sie finden sowohl für die gezielte Mutagenese (siehe 2.3.6.1.3), als auch für *Fill in*-Reaktionen (siehe 2.3.3.3) und zum Nachweis rekombinanter  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.3.7.3) und  $\lambda$ -lysogener Zellen (siehe 2.3.7.5) Anwendung.

### 2.3.7.1 Thermostabile DNA-Polymerasen

#### 2.3.7.1.1 *Taq*-Polymerase

*Taq*-Polymerase ist ein Enzymkomplex, der aus *Thermus aquaticus* stammt und von verschiedenen Herstellern entweder aus diesem isoliert oder auch als rekombinante Form angeboten wird. Das Enzym ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit hoher Prozessivität bei einem Temperaturpotimum von 72-75°C und gleichzeitig fehlender 3',5'-Exonukleaseaktivität.

*Taq*-Polymerase (InViTek) bezogen, wird zur Amplifikation eines 174bp langen pBR322-Fragmentes für Gel-Retardationsexperimente (siehe 2.6.2.2) und zum Nachweis rekombinanter  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.3.7.3) verwendet. Für Sequenzierungen nach dem *Taq cycle*-Prinzip (siehe 2.3.8.2) wird eine modifizierte, rekombinante Enzymvariante ( $\Delta$ *Taq*<sup>TM</sup> Version 2.0, USB/Amersham) eingesetzt.

10×Reaktionspuffer (InViTek):	670mM	Tris/HCl pH8,8
	160mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,1%	Tween-20

<i>Taq cycle sequencing buffer</i> (USB):	260mM	Tris/HCl pH9,5
	65mM	MgCl <sub>2</sub>

#### 2.3.7.1.2 *Pfu*-Polymerase

Diese DNA-Polymerase wird aus dem hyperthermophilen Organismus *Pyrococcus furiosus* isoliert (native *Pfu*-Polymerase, Stratagene). Das multifunktionelle Enzym weist im Vergleich verschiedener thermostabiler DNA-Polymerasen aufgrund der vorhandenen *Proofreading*-Aktivität die geringste Fehlerrate auf [Flaman *et al.*, 1994] und wird verwendet, wenn es auf eine hohe Genauigkeit in der DNA-Synthese ankommt. Das Temperaturoptimum liegt bei 68-72°C.

*Pfu*-Polymerase wird in dieser Arbeit für die *Quik change*-Mutagenese (siehe 2.3.6.1.3) und für *Fill in*-Reaktionen (siehe 2.3.3.3.1) eingesetzt.

10×Reaktionspuffer (Stratagene):	200mM	Tris/HCl pH8,0
	100mM	KCl
	60mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	Triton X-100
	100µg/ml	BSA

### 2.3.7.2 Amplifikation des *ecoRI*-Gens

Das *ecoRI*-Gen, welches in  $\lambda$ -Phagen kloniert werden soll, wird zunächst in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu wird ein pRIF309+(CH<sub>6</sub>)-Derivat als *Template* eingesetzt, das ein modifiziertes Gen trägt (pRME, siehe 3.3.1). Die Sequenzen der verwendeten *Primer* (*Eco Primer B* und *C*) sind in Tab. 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: Sequenzen der *Primer*, die zur PCR-Amplifikation des *ecoRI*-Gens verwendet werden

<i>Eco Primer B</i>	ACGAGGCAGACCTCAGGCCGGTG
<i>Eco Primer C</i>	GGCTCAGCTTGGCAAAAGGAGCC

Ansatz:	10µl	10×Reaktionspuffer ohne MgCl <sub>2</sub> (InViTek)
	3µl	50mM MgCl <sub>2</sub>
	2µl	50µM <i>Eco Primer B</i>
	2µl	50µM <i>Eco Primer C</i>
	0,1µl	pRME (1,3µg/µl)
	10µl	2mM dNTPs
	0,2µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl, InViTek)
		ad 100µl ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird mit Paraffinöl überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* (Varius TCV 5\*9, Landgraf) wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	95	300	55	90	72	60
Amplifikation	30×	95	60	55	90	72	60
abschließende Extension	1×	95	60	55	90	72	360

Das gebildete Produkt wird aufgereinigt (siehe 2.3.4.3) und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.3.2.3). Bis zu ihrer weiteren Verwendung wird die DNA bei 4°C gelagert.

### 2.3.7.3 Nachweis rekombinanter Phagen

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges (siehe 2.3.6.4) werden einzelne Plaques nach *Phageplaque-Lifting* (siehe 2.2.9.2) auf rekombinante  $\lambda$ -Phagen untersucht. Die Sequenzen der PCR-Primer (*lambda gt11 forward*, *lambda gt11 reverse*) sind in Tab. 2.11 aufgeführt.

Tab. 2.11: Sequenzen der *Primer*, die zur PCR-Analyse rekombinanter  $\lambda$ -Phagen eingesetzt werden

<i>lambda gt11 forward</i>	GGTGCGGACGACTCCTGG
<i>lambda gt11 reverse</i>	CTGTGGTCTGGTTGACC

Ansatz:        5µl        10×Reaktionspuffer ohne MgCl<sub>2</sub> (InViTek)  
                   1,5µl        50mM MgCl<sub>2</sub>  
                   1µl        70µM *lambda gt11 forward*  
                   1µl        70µM *lambda gt11 reverse*  
                   5µl        2mM dNTPs  
                   0,2µl        *Taq*-Polymerase (5U/µl, InViTek)  
                   ad 50µl ddH<sub>2</sub>O

Den vorbereiteten Ansätzen werden die *Phagelifts* zugefügt, mit Paraffinöl überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	95	300	40	90	72	60
Amplifikation	30×	95	60	40	90	72	60
abschließende Extension	1×	95	60	40	90	72	360

Im Anschluß an die PCR werden 5µl des Ansatzes auf ein natives, 10%iges Polyacrylamidgel (siehe 2.3.2.2.1) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die DNA-Fragmente nach Ethidiumbromidanfärbung unter UV-Licht analysiert.

### 2.3.7.4 Analyse der Orientierung des *ecoRI*-Genes in rekombinanten λ-Phagen

PCR-Reaktionen, die in der ersten Analyse (siehe 2.2.9) ein Produkt der richtigen Länge ergeben, werden in einer weiteren PCR auf die Orientierung des darin enthaltenen *ecoRI*-Genes untersucht. Dazu werden die betreffenden Plaques ausgestochen, in Phagenpuffer eluiert (siehe 2.2.10.3) und diese in Flüssigkulturlysaten (20ml) vermehrt (siehe 2.2.10.2). Die enthaltene λ-DNA wird isoliert (siehe 2.3.1.3) und als *Template* für die nachfolgende PCR eingesetzt. Die Sequenzen der PCR-Primer (*lambda gt11 forward*, *Eco Primer A*) sind in Tab. 2.12 aufgeführt.

Tab.2.12: Sequenzen der *Primer*, die zur PCR-Analyse rekombinanter λ-Phagen eingesetzt werden

<i>lambda gt11 forward</i>	GGTGGCGACGACTCCTGG
<i>Eco Primer A</i>	GTGATGGTGATGGTGATGCTTACTAGT

Ansatz:        5µl        10×Reaktionspuffer ohne MgCl<sub>2</sub> (InViTek)  
                  1,5µl        50mM MgCl<sub>2</sub>  
                  0,5µl        isolierte λ-DNA  
                  1µl         70µM *lambda gt11 forward*  
                  1µl         70µM *Eco Primer A*  
                  5µl         2mM dNTPs  
                  0,2µl        *Taq*-Polymerase (5U/µl, InViTek)  
                  ad 50µl ddH<sub>2</sub>O

Die Ansätze werden mit Paraffinöl überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	95	300	40	90	72	60
Amplifikation	30×	95	60	40	90	72	60
abschließende Extension	1×	95	60	40	90	72	360

Im Anschluß an die PCR werden 5µl des Ansatzes auf ein natives, 10%iges Polyacrylamidgel (siehe 2.3.2.2.1) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die DNA-Fragmente nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht analysiert. Für Phagen, die das Gen in der korrekten Orientierung enthalten, wird das PCR-Produkt weiter aufgereinigt und nach der *Taq cycle*-Methode sequenziert (siehe 2.3.8.2).

### 2.3.7.5 Nachweis $\lambda$ -lysogener Bakterienzellen

Der Nachweis  $\lambda$ -lysogener Zellen wird in einer PCR-Reaktion geführt, die Primer verwendet, welche innerhalb des Lambdarepressorbereiches *cI* binden (siehe Tab. 2.13) und ein 360bp großes Fragment erzeugen. Dazu werden die Zellen lysiert, die Zelltrümmer abgetrennt und der Lysatüberstand in die Reaktion eingesetzt.

Die Zellen einer Bakterienkolonie werden in 200µl TE-Puffer überführt, für 10min bei 95°C lysiert und danach auf Eis abgeschreckt. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (13.000×g, 2min) und der Überstand für die anschließende Nachweisreaktion eingesetzt.

Tab. 2.13: Sequenzen der *Primer*, die zur PCR-Analyse  $\lambda$ -lysogener Bakterienzellen eingesetzt werden

<i>Upper Repressor Primer</i>	ATGAGCACAAAAAAGAAA
<i>Lower Repressor Primer</i>	AGGTTCTAAGCTTAGGTGAG



Ansatz:	5µl	10×Reaktionspuffer ohne MgCl <sub>2</sub> (InViTek)
	1,5µl	50mM MgCl <sub>2</sub>
	5µl	4µM <i>Lower Repressor Primer</i>
	5µl	4µM <i>Upper Repressor Primer</i>
	5µl	2mM dNTPs
	10µl	Lysatüberstand
	0,2µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl, InViTek)
		ad 50µl ddH <sub>2</sub> O

Die Ansätze werden mit Paraffinöl überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	95	300	50	90	72	60
Amplifikation	30×	95	60	50	90	72	60
abschließende Extension	1×	95	60	50	90	72	360

Im Anschluß an die PCR werden 5µl des Ansatzes auf ein natives, 10%iges Polyacrylamidgel (siehe 2.3.2.2.1) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die DNA-Fragmente nach Ethidiumbromidanfärbung unter UV-Licht analysiert.

### 2.3.7.6 PCR-Fragmente für Spaltexperimente

Einige Spaltexperimente mit *EcoRI*-Mutanten werden mit einem 174bp langen Fragment aus pBR322 durchgeführt (siehe 2.6.1.1), dieses wird in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Das Plasmid wird mit *Bam*HI vorlinearisiert und gemeinsam mit den *Primern* (*Shift hin*, *Shift her*, siehe Tab. 2.14) in die Reaktion eingesetzt.

Tab. 2.14: Sequenzen der *Primer*, die zur PCR-Amplifikation eines 174bp langen Fragmentes aus pBR322 eingesetzt werden

<i>Shift hin</i>	GTGCCACCTGACGTCTAAGA
<i>Shift her</i>	ATACACGGTGCCTGACTGCG

Ansatz:	5µl	10×Reaktionspuffer ohne MgCl <sub>2</sub> (InViTek)
	1,5µl	50mM MgCl <sub>2</sub>
	5µl	50µM <i>Shift hin</i>
	5µl	50µM <i>Shift her</i>
	5µl	5mM dNTPs
	1µl	pBR322/ <i>Bam</i> HI (50ng/µl)
	0,2µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl, InViTek)
		ad 50µl ddH <sub>2</sub> O

Um ausreichend Material zu erhalten werden mehrere Ansätze gleichzeitig angefertigt, mit Paraffinöl überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	95	300	63	90	72	60
Amplifikation	30×	95	60	63	90	72	60
abschließende Extension	1×	95	60	63	90	72	360

Im Anschluß an die PCR werden 5µl jedes Ansatzes auf ein natives, 10%iges Polyacrylamidgel (siehe 2.3.2.2.1) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die DNA-Fragmente nach Ethidiumbromidanfärbung unter UV-Licht analysiert. Nach Abtrennung der Proteine und sonstiger Reaktionsbestandteile (siehe 2.3.4.3) werden die Ansätze vereinigt und ihre Konzentration spektroskopisch bestimmt (siehe 2.3.2.3).

## 2.3.8 DNA-Sequenzierung

In den verschiedenen Mutagenesen erzeugte Plasmidvarianten von pRIF309+(CH<sub>6</sub>) und pBlue-scriptII SK+, die sich nach dem *Screening* mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen als positiv erweisen und PCR-Produkte von rekombinanten λ-Phagen, werden sequenziert.

### 2.3.8.1 Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger

Doppelsträngige Plasmide werden nach der Didesoxy-Methode [Sanger *et al.*, 1977] mit T7 DNA-Polymerase (Pharmacia) sequenziert.

Auf die interessierende DNA (*Template*) wird vor der zu überprüfenden Sequenz ein kurzes Oligonukleotid (*Primer*) hybridisiert, dieses wird durch eine DNA-Polymerase, die den unbekanntem Bereich kopiert, verlängert. Zusätzlich zu den Desoxynukleosidtriphosphaten (eines der Desoxynukleosidtriphosphate ist radioaktiv markiert) wird in vier Parallelreaktionen je eine der vier Basen als Didesoxynukleosidtriphosphat als Monomerbaustein für die Polymerisation mit eingesetzt. Ein Didesoxynukleotid am Kettenende führt zum Abbruch der Polymerisation, da die 3'-OH-Gruppe, die für die nächste Phosphodiester-Bindung benötigt wird, fehlt. Das Verhältnis von „Desoxy“ zu „Didesoxy“ des entsprechenden Nukleotides entscheidet über die mittlere Kettenabbruchlänge. Die gebildeten Oligonukleotide werden in einem hochauflösenden, denaturierenden Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Länge getrennt. Die Basensequenz der DNA kann danach von einem Autoradiogramm abgelesen werden. Die Durchführung der Sequenzierreaktion sowie eine detaillierte Beschreibung zum Sequenziergel findet sich bei Grabowski (1993). Der Nachweis der radioaktiven Banden geschieht durch Auflegen eines Röntgenfilmes (BioMax MR-1, Kodak) über Nacht. Die Sequenzen der verschiedenen *Primer* sind in Tab. 2.15 aufgeführt.

Tab. 2.15: *Primer*, die zur Sequenzierung des *ecoRI*-Gens und des *lacZ*( $\alpha$ )-Genbereichs nach der Sanger-Methode verwendet werden

<i>Primer zur Sequenzierung des ecoRI-Gens:</i>	
<i>RI Seq.Prim. H239:</i>	TTCAAAGCAGAAGGC
<i>RI Seq.Prim. H1:</i>	GATCTTGGCGGTA
<i>RI Seq.Prim. M2:</i>	TCGAAAGATCTCATAA
<i>RI Seq.Prim. H955:</i>	TGTATTAACAAATTT
-----	
<i>Primer zur Sequenzierung des lacZ(<math>\alpha</math>)-Genbereichs:</i>	
<i>Seq.Prim. T7 Promotor:</i>	AATACGACTCACTATAG
<i>Seq.Prim. T3 Promotor:</i>	ATTAACCCTCACTAAAG
<i>Seq.Prim. Lac Prom. Rück:</i>	CAGGTTTCCCACTTGG

### 2.3.8.2 *Taq cycle-Sequenzierung*

Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente (PCR-Produkte von rekombinanten  $\lambda$ -Phagen) werden direkt mit einer Kombination aus PCR-typischen Zyklen von Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Elongation und der Didesoxy-Methode nach Sanger (siehe 2.3.8.1) unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase sequenziert (*Taq cycle sequencing*) [Srivastava *et al.*, 1992].

Für diese Arbeit wird der  $\Delta$ Taq™ Cycle Sequencing Kit Version 2.0 (USB/Amersham) verwendet, wobei die Durchführung in Anlehnung an das Herstellerhandbuch erfolgt. Die PCR-Produkte (siehe 2.3.7.2) werden nach dem QIAquick PCR Purification-Protokoll (siehe 2.3.4.3) aufgereinigt, wobei die Waschschrte zweimal wiederholt werden. Die Sequenz des verwendeten *Primers* R5 lautet GAGGGTATTCGTTGCT.

<i>Taq</i> -Polymerase-Verdünnungspuffer:	10mM	Tris/HCl pH8,0
	1mM	β-Mercaptoethanol
	0,5%	Tween-20
	0,5%	Nonidet P-40
<i>Cycle</i> -Mixe:	3,5μM	dATP, dTTP, dGTP bzw. dCTP
Terminationsmixe: ddATP:	15μM	dNTPs
	300μM	ddATP
	ddTTP:	15μM
	450μM	dNTPs
		ddTTP
	ddGTP:	15μM
	22,5μM	dNTPs
		ddGTP
	ddCTP:	15μM
	150μM	dNTPs
		ddCTP
Stop-Lösung:	95%	Formamid
	20mM	EDTA
	0,05%	Bromphenolblau
	0,05%	Xylen Cyanol FF

### Markierungsreaktion

Ansatz:	2μl	<i>Taq cycle sequencing buffer</i> (USB)
	3μl	aufgereinigtes PCR-Produkt (etwa 0,5pmol)
	1μl	<i>Primer R5</i> (0,5pmol/μl)
	0,5μl	Redivue-[α- <sup>35</sup> S]dATP (1.000Ci/mmol, Amersham)
	1μl	„G“- <i>Cycle-Mix</i>
	2μl	Δ <i>Taq</i> -Polymerase (4U/μl, USB)
		ad 20μl ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird mit Paraffin überschichtet und die Markierungsreaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	93	120	–	–	–	–
Markierung	30×	–	–	50	48	93	18

Die Reaktion wird im *Thermocycler* auf 10°C gekühlt und in die nachfolgende Terminationsreaktion eingesetzt.

### Terminationsreaktion

Ansatz: 3,5µl Markierungsansatz  
4µl Terminationsmix (A, T, G, C)

Der Ansatz wird mit Paraffin überschichtet und die Reaktion im *Thermocycler* wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Anzahl	T <sub>denat.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>anneal.</sub> [°C]	Dauer [sec]	T <sub>ext.</sub> [°C]	Dauer [sec]
Denaturierung	1×	93	120	–	–	–	–
Termination	30×	93	50	65	40	72	90

Die Reaktion wird durch Zugabe von 5µl Stop-Lösung beendet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Probenvorbereitung und Herstellung des Sequenziergels siehe Grabowski (1993).

## 2.4 Proteinisolierung

*EcoRI*-Mutanten, die durch gezielte Mutagenese (siehe 2.3.6.1.1) hergestellt und durch Sequenzierung bestätigt wurden, werden nach ihrer Expression in geeigneten Bakterienstämmen (siehe 2.2.3) aufgereinigt. Dazu wird entweder ein einstufiger Affinitätschromatographischer Ansatz (siehe 2.4.2.1.1) oder eine zweistufige Präparation verwendet (siehe 2.4.2.1.2), bei dem der Affinitätschromatographie ein zusätzlicher Ionenaustauschchromatographischer Schritt folgt.

## 2.4.1 Zellaufschluß durch Ultraschall

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgt mit Hilfe von Ultraschall. Dazu werden die eben aufgetauten Zellen in ein Becherglas überführt und für zwanzigmal 30s (*Duty cycle* 50%, *Output control* Stufe 6, 30s Pause) beschallt (Branson Sonifier 250/Ultrasonics). Die Probe wird dabei auf Eis gekühlt und nach jeder zweiten Beschallung gut durchmischt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und nicht geöffneten Zellen wird eine Ultrazentrifugation (100.000×g, 4°C, 1h) angeschlossen und das klare Zellysat weiterverwendet.

Zellen, die aus einem Kulturvolumen von 100ml stammen (siehe 2.2.12.2), werden lediglich zehnmal für 30s beschallt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgt hier für 30min bei 5.000×g und 4°C.

Sedimente aus Induktionsversuchen (siehe 2.2.12.1) werden zur Untersuchung der Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß in 2ml-Reaktionsgefäßen aufgeschlossen (fünfmal 10s, *Duty cycle* 30%, *Output control* Stufe 3), die Zelltrümmer bei 4°C sedimentiert (13.000×g, 15min) und der erhaltene Überstand in eine Spaltkinetik eingesetzt (siehe 2.6.1.2).

## 2.4.2 Säulenchromatographische Aufreinigung

### 2.4.2.1 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung und gleichzeitige Konzentrierung von *EcoRI*-Mutanten wird durch die Verwendung einer Affinitätsmatrix (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, Qiagen), die die am C-Terminus anschliessenden sechs Histidinreste bindet, möglich. Funktionelle Gruppen dieses Materials sind Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die durch Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert und an eine Agarosematrix gebunden sind [Hochuli, 1990]. Die Histidinreste können zwei der insgesamt sechs Koordinationsstellen der Kationen besetzen und fungieren unter geeigneten Pufferbedingungen als Liganden, die eine sehr effektive Bindung des betreffenden Proteines bewirken. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit Imidazol, das um die Bindungsplätze kompetiert.

#### 2.4.2.1.1 Aufreinigung von *EcoRI* aus dem 100ml- bis 500ml-Maßstab

Das Zellysat nach Ultraschallaufschluß wird mit 1ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (equilibrirt mit PDL pH7,5/0,5M NaCl/10mM Imidazol) versetzt und die Bindung für 30min bei 4°C auf einem Taumelrüttler ermöglicht. Anschließend wird die Suspension in eine 5ml-Säule überführt. Nachdem das Lysat abgetropft ist, wird das Säulenmaterial zunächst mit 10ml Equilibrierungspuffer, danach mit 10ml PDL pH7,5/0,5M NaCl/50mM Imidazol gewaschen. Zur Elution wird 1ml PDL pH7,5/0,5M NaCl/150mM Imidazol auf die Säule gegeben. Dieses wird für 15min inkubiert, nachdem zur

gleichmäßigen Benetzung des Säulenmaterials etwa 0,5ml abgetropft sind. Anschließend wird das Protein eluiert und die Säule mit 0,5ml Puffer nachgespült. Zur Stabilisierung wird die Präparation gegen einen glycerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.3).

#### 2.4.2.1.2 Aufreinigung von *EcoRI* aus dem 10l-Maßstab

1-2ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose werden auf eine Säule aufgetragen und mit 50ml PDL pH7,5/0,5M NaCl/10mM Imidazol equilibriert. Der pH-Wert und die Leitfähigkeit des Zellysates nach Ultraschallaufschluß werden mit dem des Equilibrierungspuffers abgeglichen (pH-Einstellung mit verdünntem NH<sub>3</sub>, Leitfähigkeitseinstellung durch Verdünnung mit PDL pH7,5), aufgetragen und mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Equilibrierungspuffer gewaschen. Zur Elution wird ein Gradient von 10-150mM Imidazol in PDL pH7,5/0,5M NaCl (400ml Gesamtvolumen) angeschlossen und das Eluat in 20ml-Fractionen aufgefangen. Die Eluate werden auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) auf das *EcoRI*-Protein untersucht, die entsprechenden Fractionen vereinigt und in einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt (siehe 2.4.2.2).

#### 2.4.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Die weitere Aufreinigung von *EcoRI*-Mutanten aus dem Fermentermaßstab, insbesondere die Entfernung von DNA, ist durch den Einsatz von Ionenaustauschern möglich. In der vorliegenden Arbeit wird dafür Phosphozellulose (P-Zell, Whatman) verwendet.

10ml P-Zell werden auf eine Säule aufgetragen und mit dem zehnfachen Volumen PDL pH7,2/0,1M NaCl/1mM EDTA equilibriert. Die vereinigten *EcoRI*-haltigen Fractionen aus der Affinitätschromatographie werden in pH-Wert und Leitfähigkeit mit dem Equilibrierungspuffer abgeglichen und auf die Säule gegeben. Die Säule wird mit dem zehnfachen Säulenvolumen PDL pH7,2/0,1M NaCl/1mM EDTA gewaschen, zur Elution ein Gradient von 0,1-1,5 NaCl in PDL pH7,2/1mM EDTA (400ml Gesamtvolumen) angeschlossen und das Eluat in 20ml-Fractionen aufgefangen. Die Überprüfung des Proteingehaltes der Eluate und deren Reinheit erfolgt auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2). Zur Stabilisierung der Proteine werden die Eluate dialysiert (siehe 2.4.3) und die Proteinkonzentration wird über ein UV-Spektrum (siehe 2.5.1) ermittelt.

### 2.4.3 Dialyse

Um die isolierten Proteine dauerhaft lagern zu können, werden Eluate über Nacht gegen PDL pH7,5/0,3M NaCl/70% (v/v) Glycerin dialysiert und die so erhaltenen Lösungen bei -20°C aufbewahrt.

## 2.5 Proteinanalytik

### 2.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen und zur Untersuchung von Proteinpräparationen auf DNA-Verunreinigungen werden UV/VIS-Spektren verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgt in einem Spektrophotometer (Hitachi-U3210) im Wellenlängenbereich von 320nm bis 240nm gegen Luft als Referenz.

Als Extinktionskoeffizient für *EcoRI*-Mutanten dient der Wert des Wildtypenzym:

$$\epsilon_{EcoRI, 278nm} = 8,3M^{-1}cm^{-1}.$$

### 2.5.2 Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli

Die Bestimmung der Ergebnisse von Induktionsversuchen, die Verfolgung der einzelnen Schritte einer Proteinaufreinigung (siehe 2.4) und die Überprüfung des Reinheitsgrades einer erzielten Proteinlösung geschieht durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol im diskontinuierlichen Puffersystem [Laemmli, 1970].

#### Probenvorbereitung

Sollen Proteine aus größeren Probenvolumina (>20 $\mu$ l) konzentriert werden, so werden diese durch Zugabe 1/10tel des Volumens an 100%iger TCA-Lösung gefällt und durch Zentrifugation (10.000 $\times$ g, 30min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 10 $\mu$ l Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Falls es bei Zugabe des Puffers zu einem Farbumschlag kommt, wird die Probe mit 0,5 $\mu$ l 2M Tris neutralisiert. Bei Volumina bis 20 $\mu$ l ist eine vorherige Konzentrierung nicht notwendig, sie werden direkt mit 5 $\mu$ l Laemmli-Auftragspuffer versetzt.



Zellysate werden wie unter 2.2.12.1 beschrieben erhalten.

Unmittelbar vor dem Auftrag auf das Gel werden die Proben zur Denaturierung für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt.

Laemmli-Auftragspuffer:	50mM	Tris/HCl pH6,8
	100mM	DTT
	2% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	10% (w/v)	Glycerin

### Laemmli-Gel

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele (90×65×1mm) bestehen aus einem 17,5%igen Trenngel und einem 6%igen Sammelgelanteil. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt bei konstant 30mA.

Trenngel:	17,5% (w/v)	AA:Bis (37,5:1)
	420mM	Tris/HCl pH8,8
	0,1% (w/v)	SDS
Sammelgel:	6% (w/v)	AA:Bis (37,5:1)
	125mM	Tris/HCl pH6,8
	0,1% (w/v)	SDS
Elektrodenpuffer (10fach):	250mM	Tris
	1,9M	Glycin
	1% (w/v)	SDS

### Färbung von Laemmli-Gelen (Proteinnachweis)

Der Proteinnachweis erfolgt durch Anfärbung in einer Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 und G 250 bei etwa 100°C (Nachweisgrenze 10ng).

Das Gel wird in etwa 100ml der Färbelösung überführt und einmal aufgeköcht. Zum Entfärben wird 7%ige Essigsäure verwendet. Das Gel wird darin mehrfach aufgeköcht, bis der proteinfreie Hintergrund des Gels farblos erscheint. Die Fixierung der Ergebnisse erfolgt mit dem E.A.S.Y-Dokumentationssystem.

Laemmli-Färbelösung:	0,2% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
	0,05% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G 250
	10% (v/v)	Essigsäure
	43% (v/v)	Ethanol
	7% (v/v)	Methanol

### 2.5.3 Immunoblot

Die zu untersuchenden Proteine werden zunächst auf einem denaturierenden Gel getrennt und anschließend durch elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der der spezifische Nachweis der Proteine durchgeführt wird. Der Nachweis erfolgt indirekt mit Hilfe von Antikörpern. Die primären Antikörper können durch einen mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper erkannt und gebunden werden. In einer anschließenden Farbreaktion werden die betreffenden Banden sichtbar gemacht.

#### *Westernblot*

Die Proteine werden auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) elektrophoretisch getrennt. Für den *Westernblot* wird das *Blot*papier (Whatman Ref.Nr. 426 881, Schleicher&Schüll) in *Transblot*-Puffer eingeweicht. Die Nitrozellulosemembran läßt man in *Transblot*-Puffer/30% Methanol (v/v) vorquellen. Das *Transfersandwich* wird in der Apparatur (Semidry-Blotter Pegasus, Phase) zusammengebaut und der anodische *Blot* mit 0,8mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1h durchgeführt.

Die Transfereffizienz kann durch Verwendung eines farbigen Proteinstandards (Rainbow™ Coloured Protein Molecular Weight Marker, Amersham) und/oder anschließende Färbung des Geles (siehe 2.5.23) überprüft werden.

<i>Transblot</i> -Puffer:	25mM	Tris
	19,2mM	Glycin
	0,3% (w/v)	SDS

#### Antikörperspezifischer Nachweis

Die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine werden durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Dazu werden die unbesetzten proteinbindenden Stellen der Membran zunächst mit Casein blockiert (TBS/3% Magermilchpulver) und anschließend der primäre Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen wtEcoRI vom

Kaninchen) in TBS/1% Magermilchpulver zugegeben. Der *Blot* wird gewaschen (TBS/0,05% Tween-20 beziehungsweise TBS) und mit einem sekundären Enzym-Antikörper-Konjugat (*Goat anti-rabbit IgG* gekoppelt mit *Horseradish*-Peroxidase, Sigma) in TBS/1% Magermilchpulver inkubiert.

Der Nachweis des Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt unter Verwendung eines Farbstoffes (3,3'-Diaminobenzidin in TBS in Gegenwart von Cobalt(II)chlorid) und 30%igem  $H_2O_2$ , wobei die Proteinbanden innerhalb weniger Minuten erscheinen.

TBS: 10mM Tris/HCl pH7,5  
150mM NaCl

## 2.5.4 Circulardichroismus

Die Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie ist eine spezielle Art der Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich des Spektrums. Grundlage der Methode ist die Wechselwirkung polarisierten Lichtes mit optisch aktiven Substanzen. Eine große Anzahl von Biopolymeren weist asymmetrischen Bau auf (z.B. durch das Auftreten helikaler Sekundärstrukturen), was für ihre biologische Funktion von wesentlicher Bedeutung ist. Hauptanwendungsgebiet für CD-Messungen ist Analyse von Sekundärstrukturen von Proteinen [Johnson, 1988; Johnson, 1990].

Sofern die Proteinpräparationen aus einer einstufigen Affinitätschromatographischen Aufreinigung hervorgegangen sind, werden diese vor der Messung gegen PDL pH7,5/0,3M NaCl/70% (v/v) Glycerin dialysiert, um das darin enthaltene Imidazol zu entfernen. Die Spektren werden in 0,01cm- bis 0,05cm-Küvetten in einem Jobin-Yvon Dichrograph R.J. Mark III im Wellenlängenbereich von 190-250nm aufgenommen (2nm Bandbreite, 0,03nm/sec), gespeichert und danach mit einem Kurvenanpassungsprogramm ausgewertet [Geiger *et al.*, 1989]. Das Programm ermöglicht die freie Anpassung der Spektren an Referenzspektren bekannter Proteine, deren Daten aus kristallographischen Daten gewonnen wurden, über vier Parameter (Gehalt an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Random coil* sowie die Konzentration), die wahlweise konstant oder variabel gehalten werden können. Das Ergebnis kann auf diese Weise durch Simulation überprüft werden [Chen *et al.*, 1972].

## 2.6 Proteincharakterisierung

*EcoRI*-Mutanten werden bezüglich ihrer Spaltaktivität und DNA-bindenden Eigenschaften im Vergleich zum Wildtypenzym untersucht.

### 2.6.1 Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität von *EcoRI*-Mutanten

Die Untersuchung von Eluaten aus der Aufreinigung und Rohaufschlüssen sowie aus Proteinpräparationen auf enzymatische Aktivität erfolgt im allgemeinen durch Spaltexperimente mit  $\lambda$ -DNA. Die vollständige spezifische Spaltung von  $\lambda$ -DNA (Gesamtgröße 48502bp) durch *EcoRI* ergibt 6 Fragmente von 21226, 7421, 5804, 5643, 4878 und 3530bp Größe, deren vollständig auftretendes charakteristisches Bandenmuster, nach einer elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsgemische auf einem 0,8%igen Agarosegel, zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendet wird [Grabowski *et al.*, 1996]. 1U ist als diejenige Enzymmenge definiert, die 1 $\mu$ g  $\lambda$ -DNA/60 $\mu$ l Reaktionsansatz innerhalb einer Stunde vollständig und spezifisch spaltet. Für einige spezielle Untersuchungen wird auch ein Plasmid (pUC8, siehe 2.2.6.1) oder ein PCR-Produkt (174bp-Fragment aus pBR322, siehe 2.3.7.6) eingesetzt.

Die Spaltung kann unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt werden, sodaß das untersuchte Enzym zusätzlich charakterisiert werden kann.

Wird die enzymatische Aktivität für *EcoRV* bestimmt, so ergibt die vollständige spezifische Spaltung von  $\lambda$ -DNA 20 Fragmente, deren Größen im einzelnen nicht aufgeführt werden.

#### 2.6.1.1 Bestimmung der Spaltaktivität aus Enzympräparationen und Eluaten der Aufreinigung

Da sich Enzympräparationen und Eluate aus Aufreinigungen in der in ihnen enthaltenen NaCl-Konzentration unterscheiden, wird der Reaktionsansatz so gewählt, daß sich eine Konzentration von 50mM für Standard- und Mangan-Spaltbedingungen oder 5mM für Niedrigsalz-Bedingungen im Test ergibt. In einem 15 $\mu$ l-Aliquot sind 1 $\mu$ l  $\lambda$ -DNA (cI857Sam7-DNA, 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l, Boehringer Mannheim), eine bestimmte Enzymmenge und einer der Spaltpuffer in 1facher Konzentration enthalten. Die Puffer werden gegebenenfalls auch ohne NaCl eingesetzt, diese Angabe steht daher in Klammern. In einigen Fällen werden abweichende Pufferbedingungen und andere Substrate (pUC8, 174bp-Fragment) gewählt, diese sind an entsprechender Stelle gesondert vermerkt.

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C inkubiert, nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit ein Aliquot von 15 $\mu$ l entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 $\mu$ l

Agaroseauftragspuffer gestoppt. Nach Ablauf der Kinetik werden die Proben für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt; das kleinste und das größte Fragment besitzen kohäsive Enden, deren Zusammenlagerung auf diese Weise verhindert wird. Je 17,5µl eines Zeitwertes werden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (siehe 2.3.2.1).

Standard-Spaltpuffer (10fach):	200mM	Tris/HCl pH7,5
	(500mM	NaCl)
	100mM	MgCl <sub>2</sub>
Mangan-Spaltpuffer (10fach):	200mM	Tris/HCl pH7,5
	(500mM	NaCl)
	10mM	MnCl <sub>2</sub>
Niedrigsalz-Spaltpuffer (10fach):	200mM	Tris/HCl pH8,8
	(50mM	NaCl)
	10mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.6.1.2 Bestimmung der Spaltaktivität aus Rohaufschlüssen

Der nach Ultraschallaufschluß der Zellen gewonnene Überstand (siehe 2.4.1) wird gegebenenfalls mit PDL/0,3M NaCl vorverdünnt. Der Reaktionsansatz wird so gewählt, daß in einem 15µl-Aliquot 1µl λ-DNA, 1,5µl Standard-Spaltpuffer (10fach) ohne NaCl und 5µl der Enzymvorverdünnung enthalten sind, daraus ergibt sich eine NaCl-Konzentration von 100mM im Test.

Der Ansatz wird bei 37°C inkubiert, nach 1, 2, 5 und 10min (längere Zeiten sind auf Grund der im Rohaufschluß vorhandenen Nukleasen nicht sinnvoll) ein 15µl-Aliquot entnommen, die Reaktion mit 5µl Agaroseauftragspuffer beendet und wie unter 2.6.1.1 auf einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

### 2.6.2 Untersuchung des DNA-Bindungsverhaltens (Nitrozellulosefilter-Bindung)

Die Untersuchung des DNA-Bindungsverhaltens von Proteinen ist mit Hilfe von Filterbindungsexperimenten möglich. Dazu wird radioaktiv markierte DNA eingesetzt, die mit dem zu untersuchenden Enzym in einem geeigneten Reaktionspuffer bei RT inkubiert wird. Die gebildeten

Protein-DNA-Komplexe werden auf Nitrozellulosefiltern immobilisiert und von der nicht gebundenen DNA getrennt.

Für die Filterbindungsexperimente wird ein synthetisches selbstkomplementäres, radioaktiv markiertes (siehe 2.3.3.1) Oligonukleotid (*DickAT*: TATAGAATTCTAT) verwendet [Alves *et al.*, 1989]. Dieses wird mit dem zu untersuchenden Enzym inkubiert und die gebildeten Protein-DNA-Komplexe anschließend auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert.

Die zu untersuchenden *EcoRI*-Mutanten werden mit Filterbindungspuffer, doppelsträngiges *DickAT* mit Filterbindungspuffer/50mM NaCl vorverdünnt. Die Vorverdünnungen werden in PCR Strip Tubes (Biozym) in verschiedenen Titrationsreihen gemischt und für 30min bei 30°C inkubiert. Die Nitrozellulosemembran (*Nitrocellulose Blotting Membrane* No. 11306 0,45µm Porengröße, Sartorius) wird in eine *Slot-Blot*-Apparatur (Bio-Dot™ Apparatus, Bio-Rad) eingebaut, mit Waschpuffer angefeuchtet und die Reaktionsansätze aufgebracht. Die *Slots* werden zweimal mit 250µl Waschpuffer gewaschen und die Membran bei 60°C getrocknet. Zur Detektion der radioaktiven *Spots* wird über Nacht ein Röntgenfilm (BioMax MR-1, Kodak) aufgelegt.

Filterbindungspuffer:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	20mM	EDTA
	50µM	DTE
	100µg/ml	BSA

Waschpuffer:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	50mM	NaCl
	20mM	EDTA
	50µM	DTE

Die Quantifizierung des Ergebnisses ist möglich, indem die Membran auf eine *Imaging Plate* (Fuji BAS-III) aufgelegt und diese nach der Exposition auf einem Analysator (Fuji BAS1000 Bio Imaging Analyser 486 PC) ausgewertet wird.

## 3.0 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zum Mechanismus der durch *EcoRI* katalysierten Spaltung von DNA

#### 3.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von *EcoRI*

Aufgrund der beschriebenen strukturellen Homologien der Typ II-Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII*, wie sie sich aus den Kristallstrukturen ergeben, kann vermutet werden, daß diese Enzyme einen gemeinsamen  $Mg^{2+}$ -abhängigen Katalysemechanismus der Spaltung von Phosphodiesterbindungen nutzen. Alle vier Proteine besitzen ein zentrales, fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt-Motiv, das die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste enthält. Wie die Superposition dieser Aminosäuren zeigt, ist deren Orientierung bezüglich der zu spaltenden Phosphodiesterbindung innerhalb des katalytischen Zentrums identisch (*EcoRI*: Asp91, Glu111, Lys113; *EcoRV*: Asp74, Asp90, Lys92; *BamHI*: Asp94, Glu111, Glu113; *PvuII*: Asp58, Glu68, Lys70) (Abb 3.1).

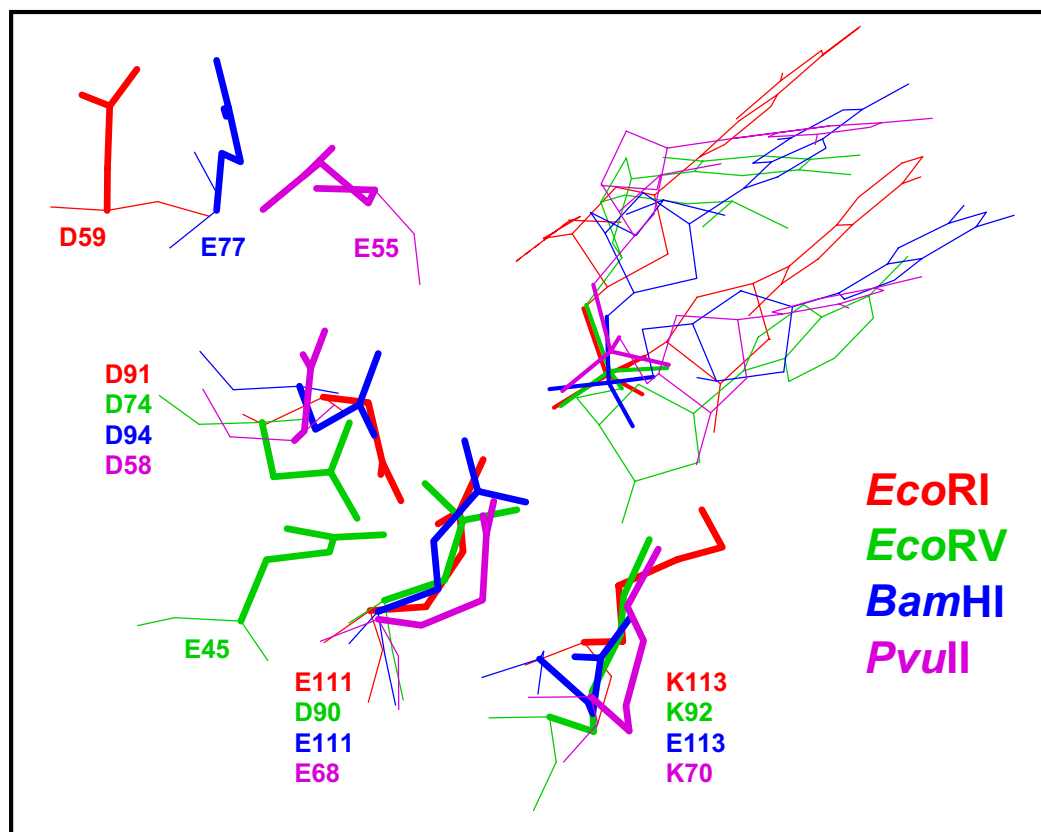


Abb.3.1: Superposition der katalytischen Zentren von Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur

Aufgrund dieser Beobachtungen, die zunächst für die Protein-DNA-Komplexe von *EcoRI* und *EcoRV* gemacht wurden, wurde das Modell der substratunterstützten Katalyse postuliert, an der ein  $Mg^{2+}$ -Ion beteiligt ist [Jeltsch *et al.*, 1992]. Da sich in einigen *EcoRV*-DNA-Kokristallen Hinweise dafür fanden, daß mindestens eine weitere Kationenbindungsstelle vorhanden ist [Winkler *et al.*, 1993], wurde für dieses Enzym ein alternativer Katalysemechanismus veröffentlicht, an dem zwei Kationen beteiligt sind [Kostrewa & Winkler, 1995]. Um eine Koordination zweier  $Mg^{2+}$ -Ionen innerhalb des katalytischen Zentrums zu ermöglichen, sind wenigstens drei saure Aminosäurereste notwendig. Bei *EcoRV* konnten für diese Funktion die Positionen Asp74/Asp90 und Glu45/Asp74 zugeordnet werden.

Durch den Vergleich der Kristallstrukturen von *BamHI*, *PvuII* und *EcoRI* mit jener von *EcoRV*, konnten für die drei Proteine keine sauren Aminosäurereste ermittelt werden, die eine zur Glu45 von *EcoRV* vergleichbare räumliche Position einnehmen. Als zusätzliche saure Aminosäure mit potentiell kationenbindender Funktion, kommen bei diesen Proteinen nur Reste in Frage, deren Position deutlich von jener, die durch Glu45 eingenommen wird, abweichen (*BamHI*: Glu77, *PvuII*: Glu55, *EcoRI*: Asp59). Bei *EcoRI* wird eine  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle durch die Aminosäurereste Asp91 und Glu111 gebildet. Asp59 könnte entsprechend der Kombination Glu45/Asp74 bei *EcoRV*, gemeinsam mit Asp91 eine weitere Kationenbindungsstelle ausbilden.

Um die mögliche Beteiligung von Asp59 an einer Kationenbindung zu überprüfen, werden durch gezielte Mutagenese Enzymvarianten der Position Asp59 hergestellt und diese anschließend bezüglich ihrer Funktion an der Katalyse untersucht. Die Asparaginsäure soll durch die Aminosäuren Alanin (D59A), Glutaminsäure (D59E), Glycin (D59G), Lysin (D59K) und Asparagin (D59N) ersetzt werden. Die Versuchsergebnisse sollen Hinweise auf die Anzahl der an der Katalyse von *EcoRI* beteiligten Kationen liefern. Es bleibt zu klären, ob Restriktionsendonukleasen des Typs II einen einheitlichen Katalysemechanismus der kationenabhängigen Spaltung von Phosphodiesterbindungen nutzen, und welchem der postulierten Modelle dieser entspricht.

## Gezielte Mutagenese

Die Mutanten der Aminosäureposition Asp59 wurden durch gezielte Mutagenese nach der *Gapped duplex*-Methode (siehe 2.3.5.1.1) hergestellt. Das doppelsträngige Vektorfragment von pRIF309+(CH<sub>6</sub>), wurde nach Spaltung mit *EcoNI* und *HindIII* (siehe 2.3.3.2), elektrophoretischer Auftrennung der Spaltfragmente (siehe 2.3.2.1) und Isolierung der DNA (siehe 2.3.4.1) erstellt. Anschließend mit der einzelsträngigen Matrize (siehe 2.3.1.2) sowie den Mutagenese-Oligonukleotiden (siehe Tab. 2.5) nach den beschriebenen Methoden ein Heteroduplex erhalten und mit diesem der reparaturdefiziente Stamm WK6mutS( $\lambda$ ) (siehe 2.2.3) transformiert. Zur Anreicherung markerpositiver Plasmide, wurde die gewonnene DNA (siehe 2.3.1.1) präparativ mit *EcoRV* gespalten, die linearisierten Plasmide isoliert (siehe 2.3.4.1), religiert (siehe 2.3.3.4) und diese zur Transformation von LK111( $\lambda$ ) (siehe 2.2.3) eingesetzt. Einige der erhaltenen Klone wurden vereinzelt, die Plasmid-DNA isoliert, diese auf die jeweils eingeführte *EcoRV*-Schnittstelle untersucht. Mit Ausnahme der Mutante D59K, für die kein markerpositiver Klon gefunden wurde, konnten alle anderen Proteinvarianten erhalten werden. Zur Bestätigung des Mutageneseerfolges



und zum Ausschluß von Sekundärmutationen wurde das gesamte *ecoRI*-Gen sequenziert (siehe 2.3.7.1).

Mit der Plasmid-DNA erfolgreich verifizierter Klone wurden Zellen des Stammes TGE900(pEcoR4) (siehe 2.2.3) transformiert und die Induzierbarkeit der Proteinexpression (siehe 2.2.12.1) überprüft.

### Aufreinigung der Mutanten

Da alle Mutanten bereits nach einer Bestimmung aus dem Rohaufschluß (siehe 2.6.1.2) deutliche Spaltaktivität aufwiesen, wurde eine einstufige affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine aus dem 100ml-Maßstab (siehe 2.4.2.1.2) durchgeführt. Abb. 3.2 zeigt die Ergebnisse der Aufreinigungen der Mutanten D59A, D59E, D59G und D59N im Vergleich zum Wildtypenzym.

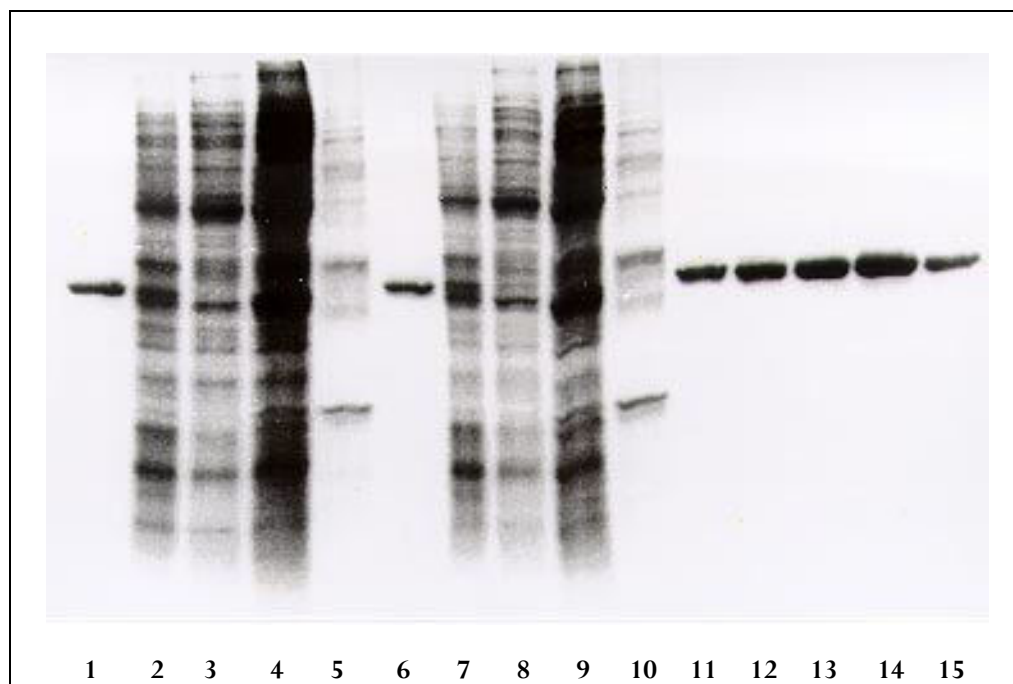


Abb. 3.2: Fraktionen der Aufreinigungen von Mutanten der Aminosäureposition Asp59 und *wtEcoRI*  
1 und 15: *EcoRI*-Standard  
2-6: Aufreinigung von *wtEcoRI* (Lysat-Überstand, Durchlauf, Waschfraktion 1, Waschfraktion 2, Eluat)  
7-11: Aufreinigung der Mutante D59A (Fraktionen entsprechend *wtEcoRI*)  
12-14: Eluate der Aufreinigungen der Mutanten D59E, D59G und D59N

Die resultierenden Präparationen wiesen eine 90-95%ige Reinheit auf. Aus ihnen wurde die Identität der *EcoRI*-Mutanten durch einen Immunoblot nachgewiesen (siehe 2.5.3). Die jeweilige Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.5.1) und ist in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Konzentrationen der Präparationen von Asp59-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym

Enzym:	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]:
wtEcoRI	0,65
D59A	0,57
D59E	0,61
D59G	0,96
D59N	0,96

### Bestimmung der Sekundärstrukturanteile

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurden von den erhaltenen Proteinen CD-Spektren aufgenommen (siehe 2.5.4). Ein Teil jeder Enzympräparation wurde zur Entfernung des aus der Aufreinigung stammenden Imidazols gegen PDL pH7,5/0,3M NaCl/70% (v/v) Glycerin dialysiert und die Aufnahme der Spektren in 0,1cm-Küvetten durchgeführt. Abb. 3.3 zeigt die erhaltenen Spektren im Vergleich mit dem Wildtypenzym.

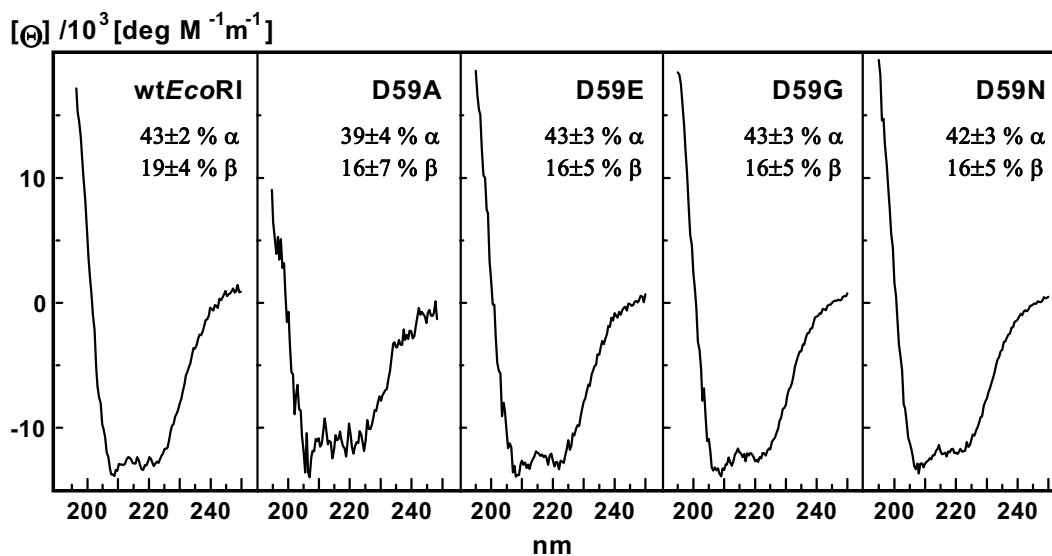


Abb. 3.3: CD-Spektren der Mutanten der Aminosäureposition 59 im Vergleich zum Wildtypenzym

Die Sekundärstrukturanteile entsprachen im Rahmen der Meßgenauigkeit für alle vier Mutanten denen des Wildtypenzym.

## DNA-Bindungs-fähigkeit

Die Untersuchung des DNA-Bindungsvermögens der Mutanten wurde mit Hilfe von Nitrozellulosefilter-Bindungsexperimenten durchgeführt (siehe 2.6.2.1). Die sich ergebenden Bindungskurven sind exemplarisch für die Mutante D59A in Abb. 3.4 dargestellt.

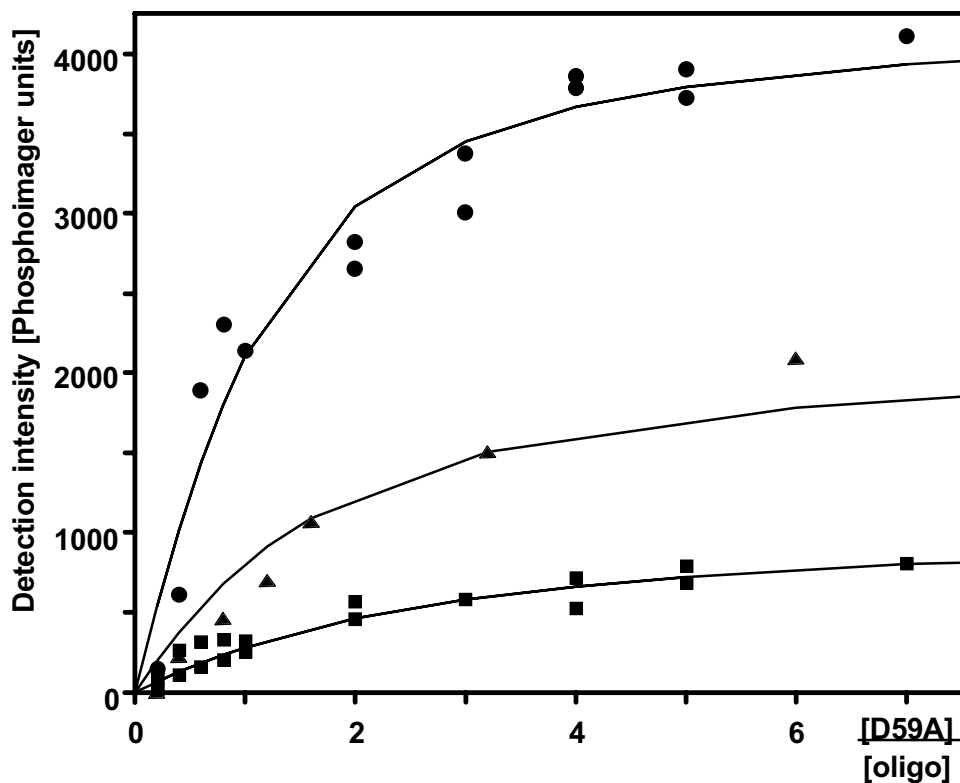


Abb. 3.4: Ergebnisse der Nitrozellulosefilter-Bindungsexperimente für die Mutante D59A im Komplex mit dem selbstkomplementären Oligonukleotid *DickAT* (■: 2.5nM, ▲: 5nM, ●: 10nM)

Die ermittelten spezifischen Bindungskonstanten  $K_{\text{ass., spez.}}$  für alle vier Mutanten wichen von der des Wildtypenzym höchstens um den Faktor 2 ab und sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Spezifische DNA-Bindungskonstanten der Asp59-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym

Enzym:	$K_{\text{ass., spez.}} [M^{-1}]$ :
wt <i>EcoRI</i>	$9,3 \pm 0,7 \times 10^7$
D59A	$1,9 \pm 0,6 \times 10^8$
D59E	$1,2 \pm 0,3 \times 10^8$
D59G	$1,3 \pm 0,4 \times 10^8$
D59N	$1,3 \pm 0,4 \times 10^8$

## Spezifische Spaltaktivität

Die enzymatische Spaltaktivität der Mutanten wurde wie unter 2.6.1.1 beschrieben unter Verwendung von Standard-Spaltpuffer durchgeführt. In Abb. 3.5 sind exemplarisch die Ergebnisse für die Mutanten D91A und D91E im Vergleich zum Wildtypenzym dargestellt.

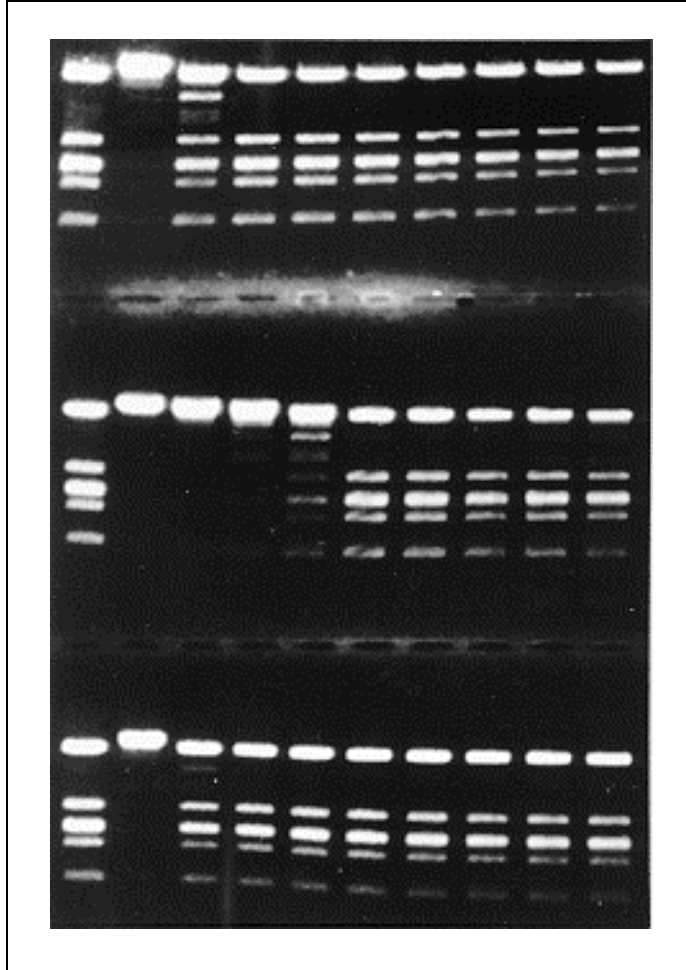


Abb. 3.5: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Mutanten D59A und D59E im Vergleich zum Wildtypenzym bei einer Enzymkonzentration von 1nM in Standard-Spaltpuffer (v.l.n.r.:  $\lambda$ -DNA/*EcoRI*-Standard und die Zeitwerte [min]: 1, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240)  
Oben: wt*EcoRI*  
Mitte: D59A  
Unten: D59E

Die Ergebnisse der spezifischen Spaltung von  $\lambda$ -DNA sind für die verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym in Tab. 3.3 zusammengefaßt.

Tab. 3.3: Spezifische Aktivitäten der Asp59-Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]
wt <i>EcoRI</i>	$1,1 \pm 0,5 \times 10^6$
D59A	$1,8 \pm 0,5 \times 10^5$
D59E	$1,1 \pm 0,5 \times 10^6$
D59G	$1,3 \pm 0,3 \times 10^5$
D59N	$1,8 \pm 0,5 \times 10^5$

Die Mutante D59E zeigte dieselbe spezifische Spaltaktivität wie das Wildtypenzym, die anderen drei Mutanten erwiesen sich in ihrer DNA-Spaltgeschwindigkeit als höchstens um den Faktor 10 langsamer als das Wildtypenzym.

### 3.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von *EcoRI*

Verschiedene Enzyme, die die Bildung oder Spaltung von Phosphodiesterbindungen katalysieren, nutzen zu diesem Zweck divalente Kationen als essentielle Kofaktoren, die sie sowohl für die Bindung des negativ geladenen Substrates als auch für die nukleophile Verschiebung der auftretenden Ladungen benötigen [Knowles, 1980]. Die Art des an der Katalyse beteiligten Kations ist dabei von Enzym zu Enzym unterschiedlich und reicht von Erdalkali- bis zu Übergangsmetallen.

Am Beispiel der Ribonuklease H konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, durch die Einführung gezielter Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum des Enzyms sogar ein kationunabhängiges, katalytisch aktives Protein zu erzeugen [Casareno *et al.*, 1995]. Im aktiven Zentrum des Proteins sind drei saure Aminosäuren enthalten (Asp10, Glu48, Asp70), wobei aufgrund der Kristallstruktur des  $Mg^{2+}$ -enthaltenden Enzyms, die Kationenbindungsstelle den Resten Asp10 und Glu48 zugeordnet werden konnte, während die dritte saure Aminosäure die Aktivierung des für die Hydrolyse notwendigen Wassermoleküls bewirkt. Durch die Einführung positiver Ladungen mittels basischer Aminosäurereste an diesen Positionen (D10R/E48R-Doppelmutante) konnte innerhalb des aktiven Zentrums eine Ladungsdichte erzeugt werden, wie sie der eines hydratisierten  $Mg^{2+}$ -Ions entspricht. Bei pH5,5 zeigte die Doppelmutante auch in Abwesenheit divalenter Kationen im Vergleich zum Wildtypenzym eine 87%ige katalytische Aktivität.

Restriktionsendonukleasen des Typs II verwenden zur spezifischen Erkennung und Spaltung von DNA bevorzugt  $Mg^{2+}$ -Ionen. Wie für *EcoRI* und *EcoRV* gezeigt wurde, können diese Enzyme auch in Gegenwart anderer Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) katalytisch aktiv sein, jedoch wird eine deutlich geringere Spaltaktivität beobachtet [Woodhead *et al.*, 1981; Vipond *et al.*, 1995].

Die Bindung und Positionierung des Kations im katalytischen Zentrum von *EcoRI* erfolgt durch die sauren Aminosäurereste Asp91 und Glu111. Diese wurden durch die Aminosäuren Arginin, Cystein beziehungsweise Histidin an den entsprechenden Positionen ersetzt und die Einzelmutanten D91C, D91R, E111H und E111R sowie die Doppelmutanten D91C/E111C, D91H/E111H und

D91R/E111R erstellt. Die Mutanten D91H, E111C, D91C/E111H und D91H/E111C waren bereits vorhanden, sie werden an entsprechender Stelle berücksichtigt [Brügner, 1994]. In den anschließenden Untersuchungen soll festgestellt werden, ob die angestrebten Mutanten eine veränderte Kationenspezifität aufweisen, also andere Kationen als das physiologische  $Mg^{2+}$  bevorzugt binden ( $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$ ) oder analog zum oben aufgeführten Beispiel unter speziellen Pufferbedingungen sogar eine kationenunabhängige Spaltaktivität aufweisen.

## Gezielte Mutagenese

Die Mutanten der Aminosäurepositionen Asp91 und Glu111 wurden ebenfalls durch gezielte Mutagenese nach der *Gapped duplex*-Methode (siehe 2.3.5.1.1) dargestellt. Das doppelsträngige Vektorfragment von pRIF309+(CH<sub>6</sub>) wurde nach Spaltung mit *HindIII* und *AsuII* (siehe 2.3.3.2) gewonnen, ansonsten wie unter 3.1.1 beschrieben vorgegangen. Zur Anreicherung markerpositiver Plasmide wurde die DNA (siehe 2.3.1.1) präparativ mit einem der *Screeningenzyme* (siehe Tab 2.5) gespalten, die linearisierten Plasmide isoliert (siehe 2.3.4.1), religiert (siehe 2.3.3.4) und diese zur Transformation von LK111( $\lambda$ ) (siehe 2.2.3) eingesetzt. Die Plasmid-DNA einiger Einzelklone wurde isoliert und auf die jeweils einzuführenden *Screeningstellen* untersucht. Zur Bestätigung des Mutageneseerfolges und zum Ausschluß von Sekundärmutationen wurde das gesamte *ecoRI*-Gen sequenziert (siehe 2.3.7.1) und die Mutanten D91C, D91R, E111H, E111R, D91C/E111C sowie D91H/E111H erhalten. Daneben wurde auch die Einzelmutante D91H erzielt, deren Untersuchung bereits Gegenstand einer früheren Arbeit war [Brügner, 1994]. Wegen der Vollständigkeit des Mutantensatzes wurde das Enzym jedoch abermals berücksichtigt. Die Mutante E111C lag als Laborpräparation vor, sie wurde an entsprechender Stelle in die Untersuchungen einbezogen.

Mit der Plasmid-DNA erfolgreich verifizierter Klone wurden Zellen des Stammes TGE900(pEcoR4) (siehe 2.2.3) transformiert und die Induzierbarkeit der Proteinexpression (siehe 2.2.12.1) überprüft.

## Aufreinigung der Mutanten

Mit Ausnahme der Mutanten D91R und D91C/E111C, die lediglich aus dem 500ml-Maßstab isoliert wurden (siehe 2.4.2.1.1), erfolgte die Aufreinigung der Mutanten D91C, D91H, E111H und D91H/E111H aus dem 10l-Maßstab, wobei dem affinitätschromatographischen Schritt (siehe 2.4.2.1) eine Ionenaustauschchromatographie (siehe 2.4.2.2.) nachgeschaltet wurde. Die erhaltenen Proteinpräparationen aus dem 10l-Maßstab wiesen eine 90-95%ige Reinheit auf, während die beiden anderen Mutanten zu 70-85%iger Homogenität aufgereinigt wurden. Die jeweilige Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.5.1) und ist in Tab. 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.4: Konzentrationen der Präparationen von Mutanten des katalytischen Zentrums von *EcoRI*

Enzym:	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]:
D91C	8,5
D91R	4,0
D91C/E111C	0,52
D91H	8,1
E111H	3,2
D91H/E111H	1,4

Eine Aufreinigung der Mutanten E111R und D91R/E111R konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Abtrennung der anderen zellulären Proteine wurde lediglich zu einem geringen Teil erreicht, so daß im Anschluß an die zweistufige Präparation keine homogenen Proteinlösungen erhalten wurden (die *EcoRI*-Mutanten stellten höchstens 30% des Gesamtproteins). In einigen Fällen wurde überhaupt keine Proteinüberexpression erzielt.

### Spezifische Spaltaktivität

Eine enzymatische Aktivität der Mutanten D91H, D91R, E111H sowie D91H/E111H konnte innerhalb von 48 Stunden weder unter Verwendung des Standard-Spaltpuffers noch der Star-Spaltpuffer ( $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen beziehungsweise pH8,8 und niedrige Ionenstärke) (siehe 2.6.1.1) festgestellt werden. Auch die Einstellung eines sauren pH-Wertes (6,0) im ansonsten unveränderten Standard-Spaltpuffer führte zu keiner spezifischen Spaltung von  $\lambda$ -DNA durch die Enzyme. Auf eine weitere kinetische Untersuchung der Mutante D91R wurde verzichtet.

Da durch die Einführung der Histidinreste eine Veränderung der Kationenspezifität des Enzymes erreicht werden sollte, wurden im folgenden verschiedene Kationen ( $\text{Me}^{2+}$ :  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) eingesetzt. Wie sich bereits bei vorhergehenden Untersuchungen der Mutanten D91H, E111C, D91C/E111H und D91H/E111C zeigte, neigen diese Proteine in Konzentrationen  $\geq 200\text{nM}$  unter den veränderten Bedingungen besonders zur Aggregation [Brügner, 1994]. Zur Stabilisierung der Proteine erwies es sich als günstig, dem Spaltpuffer BSA und Triton X-100 beizufügen:

$\text{Me}^{2+}$ -Spaltbedingungen:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	50mM	NaCl
	1mM	$\text{MeCl}_2$
	0,1mg/ml	BSA
	0,02%	Triton X-100

Eine Aktivierung der Enzyme konnte mit keinem der verwendeten Kationen erzielt werden, innerhalb von 8 Stunden wurde keine spezifische Spaltaktivität beobachtet. Insbesondere in Gegen-

wart von  $Mn^{2+}$ - und  $Co^{2+}$ -Ionen zeigte sich auf den Agarosegelen im Laufe der Kinetiken ein zunehmender Hintergrund („Schmier“) bei gleichzeitigem Verschwinden der eingesetzten  $\lambda$ -DNA-Bande, der auf eine Verunreinigung der Präparationen mit unspezifischen Nukleasen hindeutet.

Um eine Ionisierung der Histidinseitenketten ( $pK_A$  der Seitenkette: 6,0 bis 7,0) zu erreichen, wurden in weiteren Versuchen verschiedene pH-Werte (7,0; 6,5; 6,0; 5,4) der Spaltpuffer eingestellt. Durch die positive Ladung wurde zwar die Kationenbindung verhindert, jedoch könnte diese Ladung selbst möglicherweise genügen, um dem Enzym eine katalytische Aktivität zu verleihen [Casareno *et al.*, 1995]. Unter keinem der eingestellten pH-Werte kam es zu einer spezifischen Spaltung von  $\lambda$ -DNA.

Im Gegensatz zu den Histidinvarianten von *EcoRI* wiesen die cysteinhaltigen Einzelmutanten DNA-Spaltaktivität auf. D91C vermochte bei Verwendung des Standard-Spaltpuffers (10mM  $Mg^{2+}$ , pH7,5)  $\lambda$ -DNA zwar nicht spezifisch zu spalten, in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen im Ansatz konnte das Enzym jedoch aktiviert werden. Dabei wurde allerdings innerhalb von 47 Stunden kein vollständiger Umsatz des Substrates beobachtet (Abb. 3.6). Die Erhöhung des pH-Wertes auf 8,8 bewirkte ebenfalls eine geringe Aktivierung des Enzyms, diese war jedoch weniger deutlich ausgeprägt.

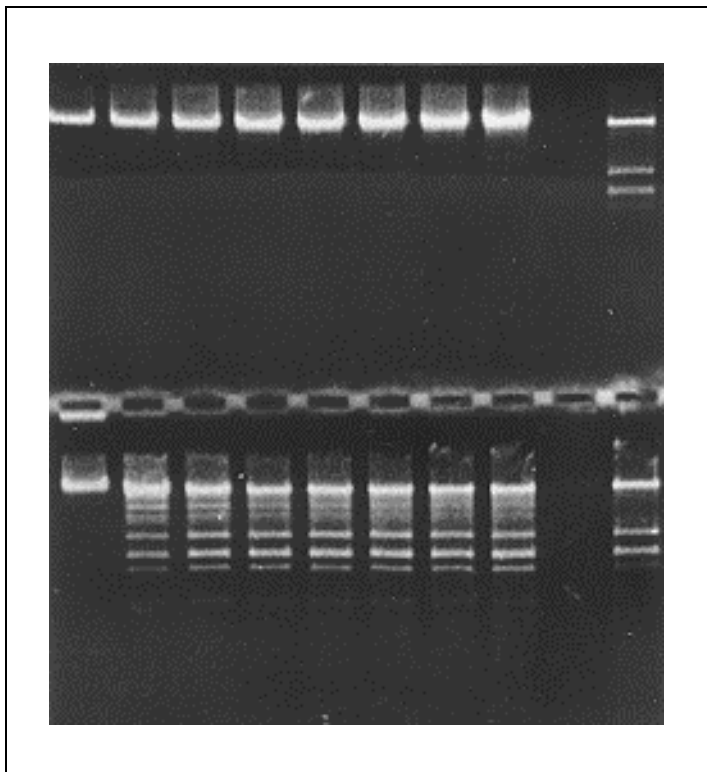


Abb. 3.6: Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität der Mutante D91C unter verschiedenen Pufferbedingungen bei einer Enzymkonzentration von 25nM  
(v.l.n.r.: Zeitwerte [h]: 4, 16, 24, 36, 44, 56, 64, 76 und  $\lambda$ -DNA/*EcoRI*-Standard)  
Oben: 1mM  $MgCl_2$ , pH7,5  
Unten: 1mM  $MnCl_2$ , pH7,5



Im Vergleich dazu wies die Mutante E111C eine deutlich höhere Spaltaktivität auf. Das Enzym war in der Lage, unter Standard-Spaltbedingungen ( $Mg^{2+}$ , pH7,5)  $\lambda$ -DNA spezifisch zu spalten. Eine Erhöhung des pH-Wertes (8,8) im ansonsten unveränderten Puffer bewirkte eine zusätzliche Aktivierung um etwa den Faktor 2. Die Angabe einer spezifischen Aktivität war für das Protein nicht ohne weiteres möglich, da auch hier die vollständige Spaltung des Substrates nicht erreicht wurde. Es fiel jedoch auf, daß die initiale Spaltung der  $\lambda$ -DNA schnell einsetzte und das dann erreichte nahezu vollständige Spaltmuster über lange Zeit unverändert blieb (Abb. 3.7). Die Verwendung von pUC8 (eine *EcoRI*-Schnittstelle) lieferte analoge Ergebnisse, der nach zweiminütiger Spaltdauer erzielte Anteil an linearisiertem Plasmid veränderte sich innerhalb eines Zeitraumes von 30min nicht.

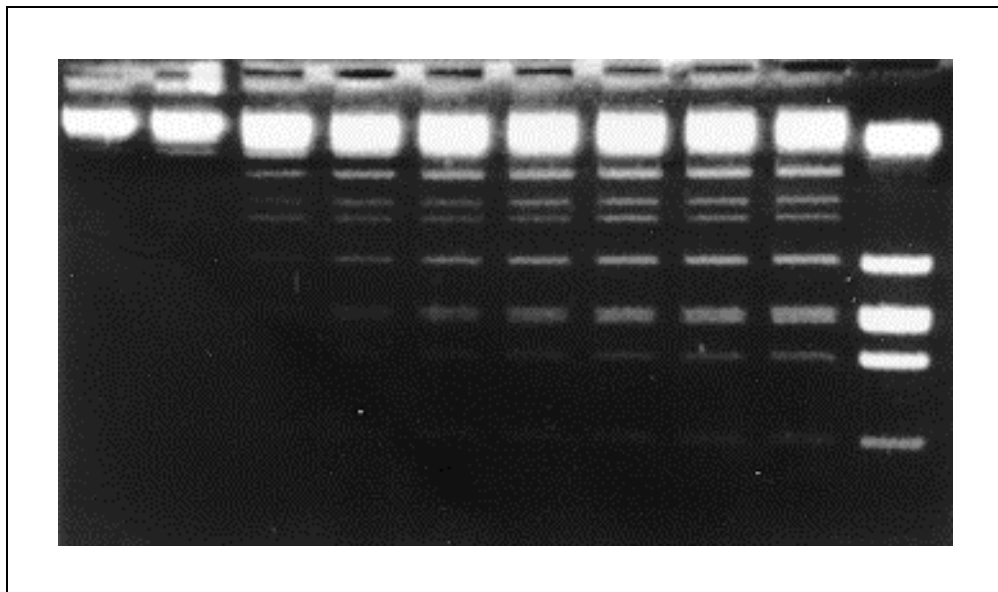


Abb. 3.7: Unvollständige Spaltung von  $\lambda$ -DNA durch die Mutante E111C bei einer Enzymkonzentration von 500nM in  $Mg^{2+}$ -Spaltpuffer, pH8,8  
(v.l.n.r.: Zeitwerte [min]: 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 und  $\lambda$ -DNA/*EcoRI*-Standard)

Falls den beschriebenen Phänomenen eine Inaktivierung von E111C zugrunde lag, könnte diese durch verschiedene Einflüsse (Oxidation des im aktiven Zentrum eingeführten Cysteinrestes, Denaturierung des gesamten Proteins) verursacht worden sein. Um die Oxidation des Cysteinrestes auszuschließen, wurden die Spaltreaktionen daraufhin in Gegenwart von 1mM DTT durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen wurde keine vollständige Spaltung erzielt. Eine weitere mögliche Ursache bestand darin, daß das Protein innerhalb des Beobachtungszeitraumes seine katalytische Aktivität durch Denaturierung verliert. Es war jedoch ohne weiteres möglich, auch nach einer einstündigen Vorinkubation von E111C in Spaltpuffer bei 37°C die spezifische Spaltung von DNA nachzuweisen. Die Erhöhung der Enzymkonzentration im Spaltansatz ergab keine vollständige Spaltung, sondern zeigte weitere Auffälligkeiten. Besonders günstige Voraussetzungen für eine effektive Spaltung von DNA durch E111C ergaben sich nur dann, wenn etwa equimolare Verhältnisse bezüglich der vorhandenen spezifischen Schnittstellen und der Enzymkonzentration eingestellt wurden. Abb. 3.8 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von Spaltversuchen mit  $\lambda$ -DNA bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

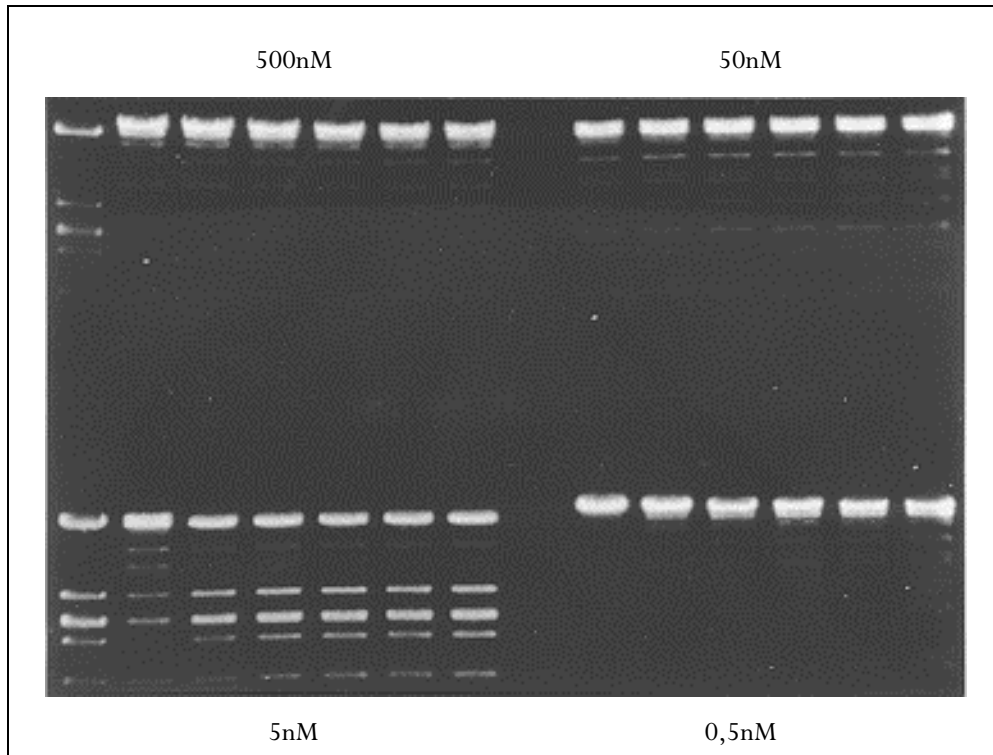


Abb. 3.8: Spezifische Spaltaktivität gegenüber  $\lambda$ -DNA (2,5nM *EcoRI*-Schnittstellen) durch die Mutante E111C bei verschiedenen Enzymkonzentrationen  
(v.l.n.r.:  $\lambda$ -DNA/*EcoRI*-Standard und die Zeitwerte [min]: 10, 20, 30, 40, 50, 60)

Da insbesondere bei hohen Proteinkonzentrationen größere Glycerinmengen aus der Enzympräparation in einen Spaltansatz eingeschleppt werden, wäre auch eine hierdurch verursachte Hemmung des Proteins vorstellbar. Der Zusatz von 0,5% (v/v) Glycerin zum Spaltansatz führte allerdings zu keiner erkennbaren Verlangsamung der Spaltung.

Die Mutante E111C bildet mit DNA stabile spezifische Komplexe aus. Spaltversuche bei denen ein 174bp langes PCR-Fragment mit zentraler *EcoRI*-Schnittstelle (siehe 2.3.7.6) eingesetzt wurde, ergaben auch unter Spaltbedingungen ( $Mg^{2+}$ -Ionen) im Gelbild detektierbare, stabile spezifische Protein-DNA-Komplexe. Abb. 3.9 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zum Wildtypenzym.

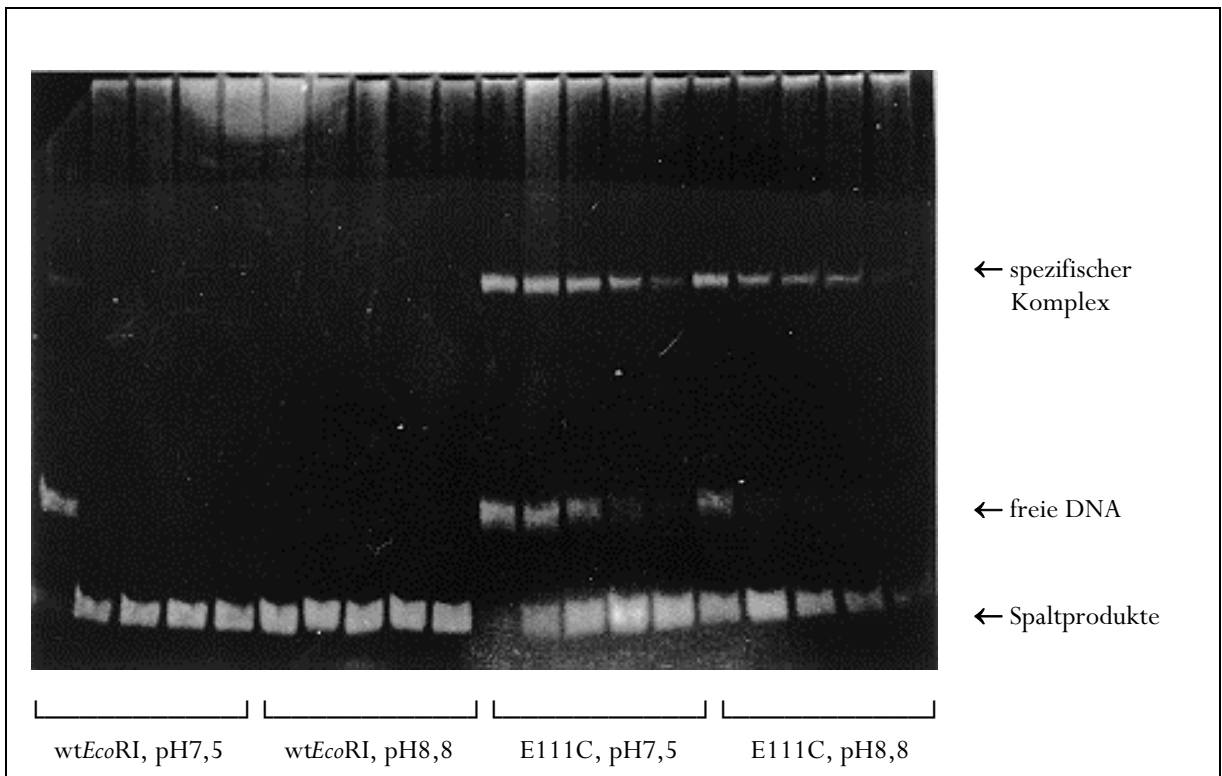


Abb. 3.9: Ausbildung stabiler, spezifischer Protein-DNA-Komplexe durch die Mutante E111C unter verschiedenen Spaltbedingungen im Vergleich zum Wildtypenzym (v.l.n.r.: Zeitwerte [min]: 2, 5, 10, 15 und 30)

Der Nachweis von Protein-DNA-Komplexen in einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) unter Verwendung eines  $\beta$ -Mercaptoethanolfreien Puffers gelang nicht. Eine Hemmung des Enzyms aufgrund kovalenter Bindung des Proteins an die DNA, ist daher unwahrscheinlich.

## 3.2 Entwicklung von positiven *In vivo*-Selektionssystemen zur Anreicherung modifizierter *EcoRI*-Proteine

Die von einem Restriktionsenzym mit seiner spezifischen Erkennungssequenz eingegangenen Wechselwirkungen stellen ein Netzwerk zahlreicher Kontakte dar. Die anschließende Kopplung zwischen der spezifischen DNA-Bindung und der Katalyse beruht gleichermaßen auf kooperativen Veränderungen der DNA- und der Proteinstruktur. Der sich daraus ergebende hochgeordnete und präzise definierte Wechselwirkungsraum zwischen Protein und Substrat läßt die Beteiligung mehrerer Aminosäuren vermuten, die die korrekte Positionierung des aktiven Zentrums und damit dessen Aktivierung vermitteln. Es scheint kaum erfolgversprechend, die Spezifität eines solchen Proteins durch gezielte Mutagenese verändern zu wollen, da bisherige Experimente zeigten, daß gleichzeitig zu viele Veränderungen vorgenommen werden müssen. Der Versuch der gezielten Spezifitätsänderung durch einzelne Aminosäureaustausche der Restriktionsendonuklease *EcoRI* gestaltet sich daher äußerst schwierig und bedarf sorgfältiger Planung.

Durch die Anwendung von positiven *In vivo*-Selektionssystemen kann eine große Zahl mutierter Proteine gleichzeitig in einem Ansatz untersucht und eine gewünschte Eigenschaft gezielt angereichert werden, ohne daß dazu einzelne Enzyme näher untersucht werden müssen. Entstanden die Proteinvarianten einer Zufallsmutagenese, können auf diese Weise auch Mehrfachmutanten dargestellt werden.

### 3.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Spaltspezifität

Zur gezielten Anreicherung von Enzymvarianten mit veränderter Sequenzspezifität soll ein Selektionssystem entwickelt werden, das von Plasmiden ausgeht, die das zufallsmutierte Endonukleasegen tragen. Mit dem Plasmidpool werden Bakterienzellen transformiert (Abb. 3.10) und durch die nachfolgenden Schritte spaltaktive Enzyme selektiv angereichert. Zum Schutz der Zellen vor einer aktiven Endonuklease, muß in diesen die zur angestrebten Restriktionsaktivität korrespondierende Methyltransferase vorhanden sein.

Der Plasmidpool besteht dabei aus drei verschiedenen Arten von Plasmiden:

- (1) Plasmide, die ein Gen tragen, welches nicht für eine zur Methyltransferase korrespondierende Restriktionsaktivität kodiert.
- (2) Plasmide, bei denen das mutierte Gen für kein funktionstüchtiges Enzym kodiert.
- (3) Plasmide, die die zur Methyltransferase korrespondierende Restriktionsaktivität kodieren. Die Selektion dieser Genvarianten ist das Ziel der Anreicherung.

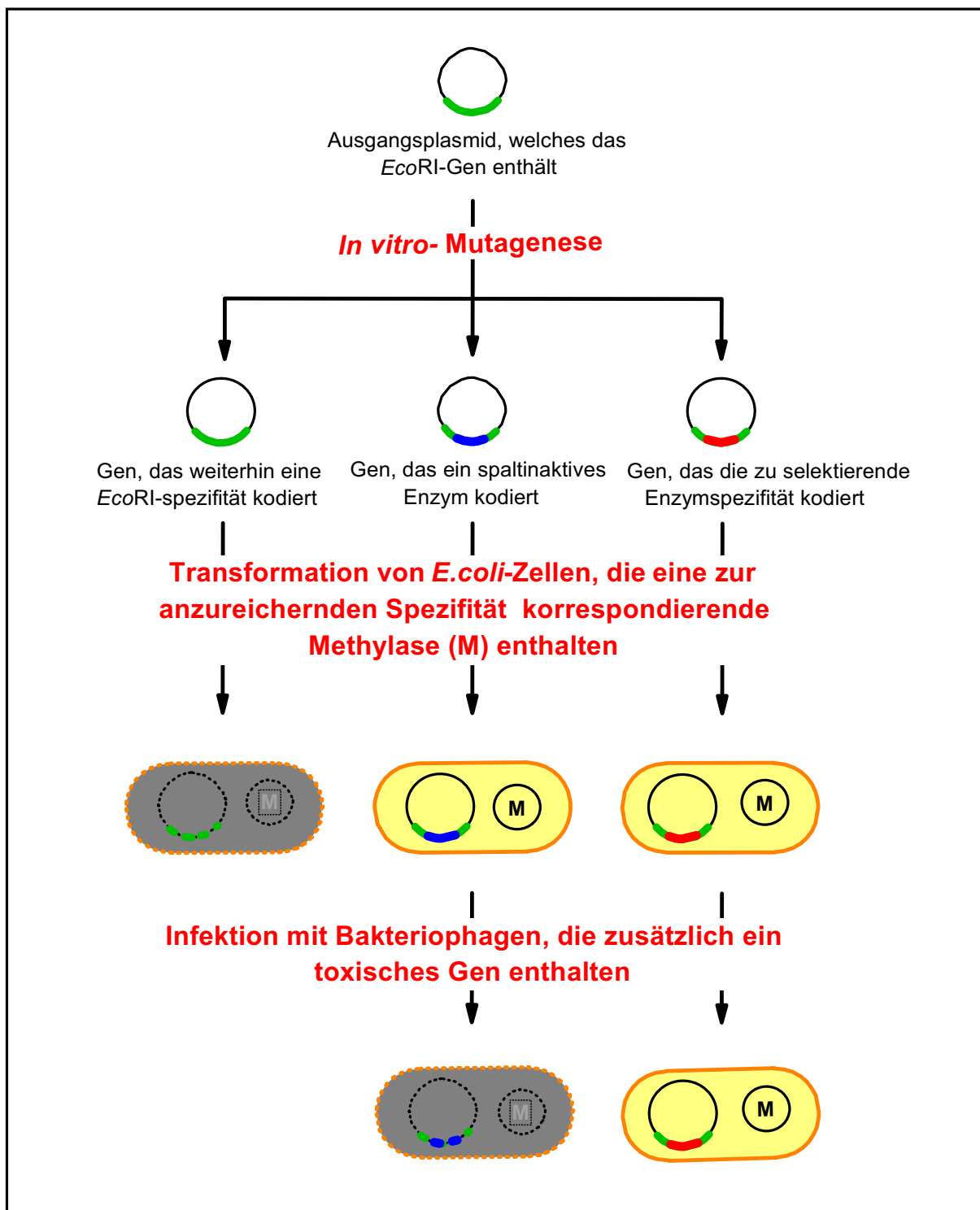


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des Selektionssystems zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität

Unter für das Endonukleasegen induzierenden Bedingungen sterben all jene Zellen ab, die Proteine exprimieren, die keine zur Methyltransferase korrespondierende Spaltaktivität aufweisen, da ihr Genom ungeschützt ist. Es gilt nun also die Zellen, die das Zielpasmid tragen, von solchen zu trennen, welche Plasmide enthalten, die für keine spaltaktive Endonuklease kodieren und in diesem Ansatz den überwiegenden Anteil des Plasmidpools ausmachen. Dazu wer-

den die Zellen mit Bakteriophagen infiziert, die ein Gen tragen, das für ein toxisches Produkt kodiert und gezielt induziert werden kann (dabei handelt es sich ebenfalls um das Gen der Restriktionsendonuklease *EcoRI*). In der Sequenz dieses Genes sind Schnittstellen für die anzureichernde Endonukleaseaktivität enthalten. Überleben sollten nur solche Zellen, die diese Phagen abwehren können. Durch die erzeugte Endonuklease können die vorhandenen Spaltstellen geschnitten und die Virus-DNA auf diese Weise zerstört werden, so daß die Expression des toxischen Genproduktes verhindert wird. Zellen ohne entsprechende Restriktionsaktivität fallen dem Phagen und dem gebildeten Genprodukt zum Opfer.

Aufgrund der unter 1.7 aufgeführten deutlichen funktionellen und strukturellen Homologien zwischen *EcoRI* und *MunI*, soll das Selektionssystem auf *EcoRI* angewendet werden, deren spezifische Erkennung und Spaltaktivität nach Zufallsmutagenese in eine *MunI*-Aktivität umgewandelt werden soll. Die grundsätzliche Funktionalität des Selektionssystems wurde zunächst ohne vorhergehende Mutagenese mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* unter Verwendung von Plasmiden, die die Gene für das Wildtypenzym oder eine spaltinaktive Mutante tragen, überprüft. Das toxische Gen wurde hierfür mit Spaltstellen für *MunI* und *EcoRV* versehen und anschließend in den einzusetzenden Bakteriophagen kloniert.

### Einführung von Restriktionsschnittstellen für *EcoRV* und *MunI* in das *ecoRI*-Gen

Das *ecoRI*-Gen, das für die nachfolgende Entwicklung eines *In vitro*-Selektionssystems als toxisches Gen Verwendung finden sollte, mußte zunächst modifiziert werden. Dazu wurden wie bereits beschrieben, durch gezielte Mutagenese nach der *Gapped duplex*-Methode (siehe 2.3.6.1.1) Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *MunI* und *EcoRV* eingeführt. Hierdurch wurde jedoch lediglich die Basensequenz des Genbereiches verändert, die Aminosäuresequenz des Genproduktes *EcoRI* blieb davon unbeeinflusst („stille“ Mutationen).

Da auf diese Weise gleichzeitig mehrere Schnittstellen für *MunI* (drei) und *EcoRV* (zwei) eingeführt wurden, war eine Linearisierung zur Anreicherung markerpositiver Plasmide mit diesen Enzymen nicht möglich. Zur Erzeugung der Schnittstellen für ein Enzym wurden alle Oligonukleotide in ein und denselben Mutageneseansatz eingesetzt. Eines der drei Oligonukleotide zur Generierung von *MunI*-Schnittstellen (siehe Tab. 2.4) zerstörte eine der beiden im Genbereich vorhandenen *XbaI*-Schnittstellen, die verbleibende Schnittstelle wurde zur Anreicherung positiver Klone genutzt. Die nach Restriktionsspaltung mit *XbaI* isolierte, lineare Plasmid-DNA wurde religiert (siehe 2.3.3.4) und mit dieser LK111( $\lambda$ ) (siehe 2.2.3) transformiert und die Plasmid-DNA vereinzelter Klone anschließend auf die einzuführenden *MunI*-Schnittstellen untersucht.

Auch die beiden Oligonukleotide für die Erzeugung von *EcoRV*-Schnittstellen wurden gemeinsam in einem Ansatz verwendet, wobei eines gleichzeitig die im Gen vorhandene *StyI*-Schnittstelle zerstörte. Die aus WK6mutS( $\lambda$ ) isolierte DNA wurde zur Anreicherung mit *StyI* behandelt und mit den nicht linearisierten Plasmiden LK111( $\lambda$ )-Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA vereinzelter Klone wurde im Anschluß auf die einzuführenden *EcoRV*-Schnittstellen untersucht.

Die DNA *screening* positiver Klone wurde zur Verifizierung des Mutageneseerfolges und um Sekundärmutationen auszuschließen, sequenziert (siehe 2.3.8.1). Die erwarteten Sequenzen konnten

auf diese Weise bestätigt werden. Das erhaltene pRIF309+(CH<sub>6</sub>)-Derivat mit Schnittstellen für *MunI* und *EcoRV* wird im folgenden als pRME bezeichnet. Die Lage der Schnittstellen innerhalb des *ecoRI*-Genbereichs ist im Anhang dargestellt.

Zur Überprüfung der Funktionalität des *ecoRI*-Gens wurden TGE900(pEcoR4)-Zellen mit dem Plasmid transformiert (siehe 2.2.3). Alle untersuchten Klone exprimierten in Induktionsversuchen (siehe 2.2.12.1) ein Protein im erwarteten Molekulargewichtsbereich. Die anschließend ermittelte Spaltaktivität des Enzyms aus dem Rohaufschluß (siehe 2.6.1.2) ergab im Vergleich mit dem Wildtypenzym keine Abweichungen.

### Klonierung des *ecoRI*-Gens in $\lambda$ gt11-Phagen

Das modifizierte *ecoRI*-Gen wurde in einer PCR-Reaktion amplifiziert (siehe 2.3.7.2) und anschließend aufgereinigt (siehe 2.3.4.3). Aus dem gewonnenen Produkt wurde unter Verwendung der im Fragment enthaltenen *EcoRI*-Schnittstellen (siehe 2.3.3.2) das Gen isoliert. Um innerhalb des *lacZ*( $\alpha$ )-Abschnittes der  $\lambda$ -Phagen (siehe 2.2.6.2.1) in das richtige Leseraster zu kommen, wurde das isolierte Gen zunächst mit kurzen, synthetischen *Linkern* (siehe Tab. 2.3) versehen. Diese wurden nach ihrer Phosphorylierung (siehe 2.3.3.1) mit dem Gen ligiert (siehe 2.3.3.4), wobei die ursprünglichen *EcoRI*-Schnittstellen zerstört und an für die nachfolgende Klonierung geeigneter Position neu generiert wurden. Das *ecoRI/Linker*-Fragment wurde mit *EcoRI* gespalten und nach Hitzeinaktivierung des Enzyms direkt zur Erzeugung rekombinanter  $\lambda$ -Phagen in eine nachfolgende Ligation mit  $\lambda$ gt11/*EcoRI*-Armen (siehe 2.3.5) eingesetzt.

Die DNA wurde *in vitro*-verpackt (siehe 2.2.7) und die so gewonnenen Phagenpartikel anschließend für die Transfektion von Y1090(r<sup>-</sup>) (siehe 2.2.3 und 2.2.2.2) genutzt. Die gebildeten Plaques wurden mit Hilfe einer PCR-Nachweisreaktion unter Verwendung der *Primer lambda gt11 forward* und *reverse* (siehe Tab. 2.11) auf rekombinante Phagen untersucht (siehe 2.3.7.3). Dazu wurden Phagen aus einzelnen Plaques auf einer Nylonmembran immobilisiert (siehe 2.2.9.2) und in einen vorbereiteten PCR-Ansatz überführt.  $\lambda$ -Phagen, die das *ecoRI*-Gen trugen, ergaben dabei PCR-Produkte von 1021bp Länge, Wildtypphagen lieferten lediglich 87bp lange Produkte.

Ergaben sich Produkte der richtigen Länge, so wurde über eine weitere PCR-Reaktion die Orientierung des *ecoRI*-Gens innerhalb des *lacZ*( $\alpha$ )-Bereiches der Phagen ermittelt (siehe 2.3.7.4). Einer der verwendeten *Primer* bindet innerhalb des *ecoRI*-Gens (*EcoPrimer A*, siehe Tab. 2.12), so konnten in Verbindung mit dem *Primer lambda gt11 forward* nur bei korrekter Orientierung des Gens Produkte von 789bp Länge entstehen.

Plaques rekombinanter  $\lambda$ -Phagen, die nach den Voruntersuchungen positive Ergebnisse lieferten, wurden ausgestochen, die Phagen daraus eluiert (siehe 2.2.10.3) und in Plattenlysaten vermehrt (siehe 2.2.10.1). 20ml einer bakteriellen Vorkultur von Y1090(r<sup>-</sup>) (siehe 2.2.2.1) wurden mit 25 $\mu$ l der gewonnenen Phagensuspension transfiziert und 5h bei 37°C geschüttelt, danach 100 $\mu$ l Chloroform zugegeben und die Kultur für weitere 15min bei 37°C geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden sedimentiert und die Phagen-DNA isoliert (siehe 2.3.1.3).

Die gewonnene DNA wurde zur Bestätigung der Ergebnisse erneut in die oben genannten PCR-Reaktionen eingesetzt. Produkte der richtigen Länge wurden aus Agarosegelen aufgereinigt (siehe 2.3.4.3) und nach der *Taq cycle*-Methode (siehe 2.3.8.2) sequenziert.

Von den nach *In vitro*-Verpackung der Phagen-DNA und Transfektion der Bakterienzellen gebildeten Plaques wurden 89 Einzelplaques untersucht. Nach der ersten PCR ergaben 8 *Phagelifts* ein Produkt der richtigen Länge (1021bp), von denen 5 (Plaque-Nummern: P17, P29, P33, P51 und P89) das *ecoRI*-Gen in der korrekten Orientierung enthielten. In der nachfolgenden Sequenzierung erwiesen sich zwei der  $\lambda$ -DNAs ( $\lambda$ P29 und  $\lambda$ P51) als nicht lesbar, eine DNA ergab eine falsche Sequenz ( $\lambda$ P17), eine enthielt das *ecoRI*-Gen mit einem *Linker* ( $\lambda$ P89) und eine weitere ergab eine Sequenz, in der drei *Linker* eingebaut wurden ( $\lambda$ P33). Sowohl  $\lambda$ P89 als auch  $\lambda$ P33 wurden daraufhin weiter untersucht.

## Überprüfung der Induzierbarkeit und Funktionalität des *ecoRI*-Genproduktes

Zur Überprüfung der Induzierbarkeit und Funktionalität des *ecoRI*-Genproduktes wurden unter Verwendung der Plaqueeeluate  $\lambda$ -lysogene Zellen von Y1089( $r^-$ , pEcoR4) (siehe 2.2.3) erzeugt (siehe 2.2.8.2). Klone, die bei 42°C ein deutlich schlechteres Wachstumsverhalten zeigten, wurden zunächst im kleinen Maßstab (5ml) für 1-2 Stunden induziert (siehe 2.2.12.5) und die Proteine auf einem Laemmli-Gel (siehe 2.5.2) elektrophoretisch getrennt. Weiterhin wurden Zellen aus einem solchen Ansatz für eine Aktivitätsbestimmung aus dem Rohaufschluß herangezogen (siehe 2.6.1.2).

Klone, für die sich eine Spaltaktivität nachweisen ließ, wurden im 100ml-Maßstab angezogen (2.2.12.5), induziert und *wtEcoRI* daraus aufgearbeitet (siehe 2.4.2.1.1). Das aufgereinigte Protein wurde zur Bestimmung der Spaltaktivität in Kinetiken eingesetzt (siehe 2.6.1.1) und seine Identität im Immunoblot (siehe 2.5.3) nachgewiesen.

Je 15 der nach Transfektion mit Phagen aus dem Einzeleluat für  $\lambda$ P89 und  $\lambda$ P33 erhaltenen lysogenen Y1089( $r^-$ , pEcoR4) wurden vereinzelt und bei 30°C oder 42°C inkubiert. 5 Klone mit deutlich gehemmttem Wachstum wurden für eine weitere Untersuchung ausgewählt. Bereits nach 1h Induktion waren für alle Klone auf dem Laemmli-Gel schwache Induktionsbanden zu erkennen. Die anschließende Bestimmung der Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß ergab nur für  $\lambda$ P33 ein eindeutiges Spaltpattern, während für  $\lambda$ P89 lediglich eine beginnende Spaltung zu detektieren war. Die folgende Aufarbeitung des Proteines aus 100ml-Kulturen von je 2 Klonen für jeden Phagen, konnte dieses erste Ergebnis bestätigen. Auch hier war die *wtEcoRI*, die aus  $\lambda$ P33-lysogenen Zellen isoliert wurde, das deutlich aktivere Enzym (Abb. 3.11).



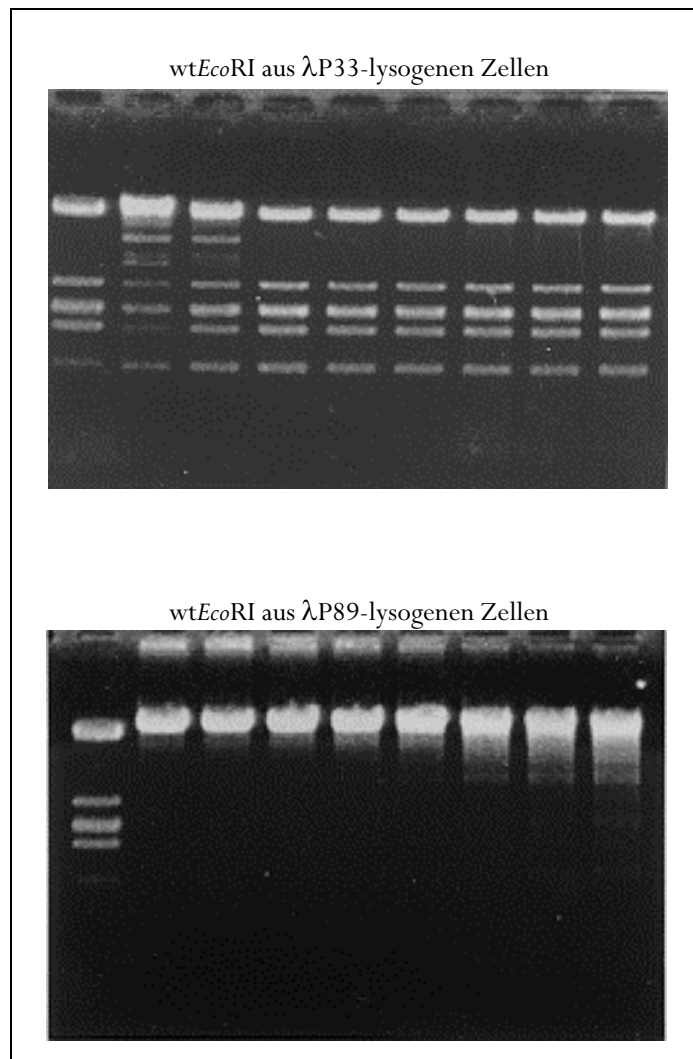


Abb. 3.11: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von wtEcoRI, die aus  $\lambda$ P33- beziehungsweise  $\lambda$ P89-lysogenen Y1089( $r^-$ , pEcoR4) isoliert wurde (v.l.n.r.:  $\lambda$ -DNA/EcoRI-Standard und die Zeitwerte [min]: 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45 und 60)

Der antikörperspezifische Nachweis nach *Westernblot* war nur für das aus  $\lambda$ P33-lysogenen Zellen gewonnene Protein eindeutig zu führen. Für weitere Arbeiten wurden daher  $\lambda$ P33-Phagen eingesetzt.

### Wirkung von $\lambda$ gt11-Phagen auf verschiedene Bakterienstämme

Um zu überprüfen, welche Bakterienstämme sich durch  $\lambda$ gt11-Phagen am effektivsten transfizieren lassen, wurden für verschiedene Stämme sowohl mit  $\lambda$ gt11-Wildtypphagen als auch mit  $\lambda$ P33-Phagen die Überlebensraten bestimmt. Um die Phagen in methylierter Form zu erhalten, wurden diese zunächst in Plattenlysaten (siehe 2.2.10.1) in Y1090 ( $r^-$ , pEcoR4) (siehe 2.2.6.1), die die *EcoRI*-Methylase exprimieren, vermehrt. Da das in den Phagen klonierte *ecoRI*-Gen über die in ihm enthaltene *EcoRI*-Schnittstelle eingesetzt wurde, sollte auf diese Weise bei der späteren

Induktion des Genproduktes weitestgehend verhindert werden, daß das Enzym sein eigenes Gen aus den Phagen herauschneidet und die toxische Wirkung des Proteins damit nicht zur Entfaltung kommen kann.

Bakterielle Vorkulturen (siehe 2.2.2.2) wurden entsprechend 2.2.11.1 vorverdünnt und etwa mit dem 50fachen Überschuß an methylierten Phagen versetzt und zur Transfektion der Zellen 20min bei 32°C inkubiert. Zur Induktion des phagenkodierten *ecoRI*-Gens wurde IPTG zugegeben, 5min bei 42°C, danach für weitere 30, 60, 90 oder 120min bei 37-38°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen verdünnt, so daß in einem ausplattierten Volumen von 100µl etwa 1000 Zellen enthalten waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu einer Kontrolle, der keine Phagen zugesetzt wurden, bestimmt.

Für die Untersuchung wurden verschiedene Stämme verwendet, von denen hier stellvertretend LE392 und Y1090(r<sup>-</sup>) (siehe 2.2.3) aufgeführt werden. Nach der Bebrütung über Nacht ergaben sich die in Tab. 3.5 aufgeführten Koloniezahlen.

Tab. 3.5: Vergleich der Überlebensraten von verschiedenen Bakterienstämmen gegenüber λgt11- und λP33-Phagen

Bakterienstamm:	Ansatz:	Anzahl Kolonien nach einer Inkubationszeit von [min]:				
		0	30	60	90	120
LE392	Kontrolle	≈500	≈500	≈500	>500	>1.000
	λgt11	56	24	21	10	17
	λP33	43	81	9	8	9
Y1090(r <sup>-</sup> )	Kontrolle	≈500	≈500	≈500	≈500	>500
	λgt11	19	1	1	0	0
	λP33	1	0	0	0	15

Für den Stamm Y1090(r<sup>-</sup>) ergaben sich die wenigsten überlebenden Zellen, daher wurde dieser für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Da sich jedoch nach 120minütiger Inkubationszeit im Vergleich zu den anderen Zeiten 15 Kolonien bildeten, wurden diese anschließend in einer PCR-Reaktion (siehe 2.3.7.5.) untersucht. Auf diese Weise konnte fest gestellt werden, daß lediglich 3 der Kolonien λ-lysogen geworden waren, die verbleibenden 12 Proben ergaben kein PCR-Produkt und konnten anscheinend nicht von den Phagen transfiziert werden.

Um einen besseren Vergleich der Wirkung der Wildtypphagen im Vergleich zu den λP33-Phagen zu ermöglichen, wurden in einem weiteren Versuch nach einer Inkubationszeit von 30, 60 oder 90min, mehrere Verdünnungstufen transfizierter Bakterienzellen von Y1090(r<sup>-</sup>) ausplattiert und die Kolonien im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Phagen ausgezählt (siehe Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Überlebensraten von Y1090(r<sup>-</sup>) gegenüber  $\lambda$ P33- oder  $\lambda$ gt11-Phagen für verschiedene Verdünnungsstufen

Ansatz:	Anzahl Kolonien nach einer Inkubationszeit von [min]:			
	0	30	60	90
Kontrolle	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
$\lambda$ gt11	$\cong 150$	>500	$\cong 200$	69
$\lambda$ P33	$\cong 150$	29	17	0
-----				
Kontrolle	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000
$\lambda$ gt11	$\cong 150$	123	48	8
$\lambda$ P33	17	0	1	0
-----				
Kontrolle	$\cong 150$	$\cong 150$	$\cong 150$	$\cong 200$
$\lambda$ gt11	26	19	6	2
$\lambda$ P33	5	0	0	0

Nach einer 90minütigen Inkubation bei 37-38°C konnten für die Bakterienzellen keine Überlebenden gefunden werden, sofern diese mit dem  $\lambda$ P33-Phagen infiziert wurden. Wurden für die Transfektion Wildtypphagen eingesetzt, so waren je nach Verdünnungsstufe zwischen 2 bis 69 überlebende Zellen zu detektieren.

### Plasmidkurierung von Y1090(r<sup>-</sup>)

Die grundsätzliche Funktionalität des Selektionssystems sollte mit Plasmiden überprüft werden, die Gene enthalten, welche für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (pRIF309+(CH<sub>6</sub>)) und *EcoRV* (pRV03) kodieren. Dabei kamen für beide Enzyme sowohl Plasmide, die für die Wildtypformen (wt*EcoRI* und wt*EcoRV*), als auch solche, die für katalytisch inaktive Mutanten (D91A von *EcoRI* und D90A von *EcoRV*) kodieren, zum Einsatz. Bei den Plasmiden handelt es sich um pBR322-Derivate (siehe 2.2.6.1), die den ColE1-*Ori* tragen. Mit ihnen sollten Zellen des Stammes Y1090(r<sup>-</sup>) transformiert werden. Diese enthielten jedoch bereits ein ColE1-Derivat (pMC9), das für den *lac*-Repressor kodiert. Die Zellen wurden daher zunächst von pMC9 kuriert (siehe 2.3.8.3), denn für das hier zu etablierende System ist eine Expressionskontrolle der Gene rekombinanter  $\lambda$ -Phagen nicht notwendig. Die plasmidkurierten Zellen (Y1090(r<sup>-</sup>)cur8) wurden anschließend mit  $\lambda$ -Phagen auf ihre Infizierbarkeit untersucht.

Eine Vorkultur (siehe 2.2.2.2) von Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 wurde entsprechend 2.2.11.1 vorverdünnt und mit dem 50fachen Überschuß an methylierten Phagen versetzt, 20min bei 32°C inkubiert, danach 5min bei 42°C und anschließend für weitere 30, 60 und 90min bei 37-38°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen verdünnt und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu einer Kontrolle, der keine Phagen zugesetzt wurden, bestimmt. Die Ergebnisse,

die für die Transfektion von Y1090(r)cur8 mit  $\lambda_{gt11}$  und  $\lambda_{P33}$  erzielt wurden sind in Tab. 3.7 zusammengefaßt.

Tab. 3.7: Toxizität von  $\lambda_{P33}$ -Phagen für verschiedene Verdünnungsstufen von Y1090(r)cur8 im Vergleich zu  $\lambda_{gt11}$ -Phagen

Ansatz:	Anzahl Kolonien nach einer Inkubationszeit von [min]:			
	0	30	60	90
Kontrolle	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
$\lambda_{gt11}$	$\cong 300$	$\cong 500$	$\cong 500$	$\cong 1.000$
$\lambda_{P33}$	$\cong 300$	$\cong 300$	$\cong 500$	$\cong 1.000$
Kontrolle	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000
$\lambda_{gt11}$	57	77	132	8
$\lambda_{P33}$	73	83	112	10
Kontrolle	57	65	85	165
$\lambda_{gt11}$	3	8	8	11
$\lambda_{P33}$	7	8	10	13

Da sich auf diese Weise keine Unterschiede in der Toxizität zwischen Wildtyp- und  $\lambda_{P33}$ -Phagen ermitteln ließen, wurde in einem weiteren Ansatz die Transfektion der Zellen in Gegenwart von IPTG versucht, obwohl dieses auf die vorliegenden Zellen keinen Einfluß haben sollte, da das den *lac*-Repressor kodierende Plasmid pMC9 fehlt. Die ermittelten Koloniezahlen sind in Tab. 3.8 zusammengefaßt.

Tab. 3.8: Toxizität von  $\lambda_{P33}$ -Phagen in Gegenwart von IPTG für verschiedene Verdünnungsstufen von Y1090(r)cur8 im Vergleich zu  $\lambda_{gt11}$ -Phagen

Ansatz:	Anzahl Kolonien nach einer Inkubationszeit von [min]:			
	0	30	60	90
Kontrolle	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
$\lambda_{gt11}$	$\cong 1.000$	70	67	65
$\lambda_{P33}$	>2.000	18	26	11
Kontrolle	$\cong 1.000$	$\cong 1.000$	$\cong 1.000$	$\cong 1.000$
$\lambda_{gt11}$	$\cong 100$	2	6	12
$\lambda_{P33}$	$\cong 100$	0	0	1
Kontrolle	73	5	71	$\cong 200$
$\lambda_{gt11}$	10	0	0	1
$\lambda_{P33}$	5	0	0	0

In Gegenwart von IPTG im Inkubationsansatz konnten regelmäßig weniger Y1090(r<sup>-</sup>)cur8-Zellen überleben, wenn diese mit  $\lambda$ P33-Phagen transfiziert wurden. Dieser Effekt ist nicht zu erklären, denn durch die Zellen wird nach ihrer Kurierung von pMC9 kein *lac*-Repressor mehr gebildet.

## Überprüfung der Funktionalität des Selektionssystems

Bevor die kurierten Y1090(r<sup>-</sup>)-Zellen mit den Plasmiden für die Endonukleasen versehen werden konnten, wurden diese zum Schutz der zelleigenen DNA zunächst mit Plasmiden (siehe 2.2.6.1) für die korrespondierenden Methylasen (pEcoR4, pLBM4422) und für den thermosensitiven Lambdarepressor *cl857* (pRK248), der die Expression der plasmidkodierten Restriktionsendonukleasegene reguliert, transformiert. So vorbereitete Zellen wurden anschließend mit den Plasmiden für das *EcoRI*- oder das *EcoRV*-Wildtypenzym beziehungsweise deren spaltinaktiven Mutanten D91A oder D90A transformiert. Die erzielten Zellen enthielten also drei Plasmide, die verschiedenen Kompatibilitätsgruppen angehören und gemeinsam stabil innerhalb einer Zelle gehalten werden können:

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pEcoR4, pRME: wt*EcoRI* („wt*EcoRI*“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pEcoR4, pRME: D91A („D91A“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pLBM4422, pRV03: wt*EcoRV* („wt*EcoRV*“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pLBM4422, pRV03: D90A („D90A“)

Für die Zellen, die Plasmide enthielten, welche für die Wildtypendonukleasen kodieren, wurde die Funktionalität der Gene durch Nachweis der Spaltaktivität aus dem Rohausschluß (siehe 2.6.1.2) nach Induktion bei 42°C für 5, 10 und 15min bestimmt. Bereits nach einer 5minütigen Induktion bei 42°C war eine Spaltaktivität zu detektieren.

Ob diesen Zellen die Abwehr rekombinanter, toxischer  $\lambda$ -Phagen durch Induktion der Endonukleasegene möglich ist, wurde mit dem unter 2.2.11.2 beschriebenen Testsystem überprüft. Die Zellen wurden zur Expression der Endonukleasen für verschiedene Zeiten bei 42°C vorinkubiert, anschließend bei 32°C temperiert und  $\lambda$ P33-Phagen im mindestens 10fachen Überschuß zugegeben. Nach 20minütiger Transfektionszeit wurden die toxischen Genprodukte der Phagen induziert und die Zellen für weitere 30min bei 38°C bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen verdünnt und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu Kontrollen, denen keine Phagen zugesetzt wurden, bestimmt. Die toxische Wirkung der Phagen wurde durch die Infektion plasmidfreier Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 zusätzlich sicher gestellt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien für die verschiedenen Endonukleasen sind in Tab. 3.9 dargestellt.

Tab. 3.9: Abwehr von rekombinanten, toxischen  $\lambda$ P33-Phagen für verschiedene Verdünnungsstufen von Zellen, die induzierbare Endonukleasegene tragen

Stamm:	Phagenzugabe:	Anzahl Kolonien nach Inkubation der Endonukleasegene [min]:			
		0	5	10	15
„wtEcoRI“	+	$\cong 200$	$\cong 300$	$\cong 250$	$\cong 500$
	-	$\cong 200$	$\cong 500$	$\cong 150$	$\cong 500$
	+	68	97	18	108
	-	180	78	60	80
	+	23	12	3	5
	-	25	9	4	5
„D91A“	+	30	$\cong 150$	$\cong 100$	$\cong 150$
	-	$\cong 1.000$	$\cong 250$	$\cong 500$	$\cong 250$
	+	4	21	23	18
	-	$\cong 200$	53	66	60
	+	1	4	2	3
	-	30	4	12	4
„wtEcoRV“	+	125	$\cong 500$	$\cong 500$	$\cong 500$
	-	$\cong 400$	$\cong 500$	$\cong 1.000$	$\cong 1.000$
	+	31	$\cong 150$	$\cong 100$	$\cong 150$
	-	$\cong 200$	$\cong 100$	$\cong 500$	$\cong 150$
	+	6	9	14	32
	-	38	13	30	18
„D90A“	+	26	$\cong 100$	42	58
	-	$\cong 2.000$	$\cong 500$	$\cong 500$	$\cong 500$
	+	1	15	14	2
	-	$\cong 500$	$\cong 100$	$\cong 100$	$\cong 150$
	+	0	0	1	0
	-	129	16	4	25
Y1090(r <sup>-</sup> )cur8	+	23	3	4	13
	-	$\cong 1.000$	$\cong 500$	$\cong 1.000$	$\cong 1.000$
	+	0	1	0	1
	-	$\cong 400$	$\cong 150$	$\cong 150$	$\cong 150$
	+	0	0	0	0
	-	$\cong 150$	32	35	25

Das Verhältnis der überlebenden Zellen, die mit  $\lambda$ P33-Phagen infiziert wurden, betrug im Vergleich zu solchen ohne Phagenzusatz für plasmidfreie Y1090(r<sup>-</sup>)cur8 mindestens 1:100. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, wie lange die Zellen bei 42°C gehalten wurden.

Der Vergleich der Überlebensraten von Zellen, deren Endonukleasegene induziert wurden, mit solchen, bei denen keine Induktion stattfand, ergab für die beiden Restriktionsendonukleasen unterschiedliche Ergebnisse. Für wt*EcoRI* und ihre spaltinaktive Mutante D91A wichen die erzielten Koloniezahlen höchstens um den Faktor 3 voneinander ab. Zellen mit *wtecoRV*-Gen dagegen konnten nach dessen Induktion die Phagen etwa um den Faktor 10 besser abwehren als Zellen, die die Mutante D90A exprimierten.

### Selektionstestsystem

Da Bakterienzellen, die ein induzierbares Endonukleasegen enthalten, einen eindringenden  $\lambda$ -Phagen nur dann effektiv abwehren können, wenn es sich bei dem Enzym um ein funktionelles Protein handelt, wurden in einem weiteren Versuch die Anreicherung von Zellen, die ein spaltaktives Enzym exprimieren können, versucht. Ansätze, die einen höheren Anteil von Zellen mit Plasmiden enthalten, die über das Wildtypenzym verfügen, sollten auf diese Weise höhere Koloniezahlen ergeben als solche, denen kein spaltaktives Protein zur Verfügung steht, das zur Phagenabwehr genutzt werden kann. Dazu wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pLBM4422, pRV03: wt*EcoRV* („wt*EcoRV*“)

Y1090(r<sup>-</sup>)cur8: pRK248, pLBM4422, pRV03: D90A („D90A“)

Die Zellen wurden in Vorkulturen angezogen und wie unter 2.2.11.3 beschrieben in verschiedenen Verhältnissen („wt*EcoRV*“ : „D90A“) zusammengemischt. Die Verdünnungen wurden bei 32°C temperiert und anschließend mit dem 10fachen Überschuß an  $\lambda$ P33-Phagen versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 20min wurden die Endonukleasegene induziert (5min, 42°C) und die Zellen anschließend für 30min bei 38°C bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Aliquot der Zellen verdünnt und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert. Dem Rest wurden in einem weiteren Infektionszyklus erneut Phagen zugegeben, wie beschrieben inkubiert, verdünnt und ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu Kontrollen, denen keine Phagen zugesetzt wurden, bestimmt. Die Anzahlen der sich ergebenden Kolonien sind in Tab. 3.10 zusammengefaßt.

Tab. 3.10: Anreicherung von Zellen, die eine spaltaktive Endonuklease exprimieren, vor einem zunehmenden Hintergrund von Zellen, die ein spaltinaktives Protein enthalten

Verhältnis: „wt <i>EcoRV</i> “: „D90A“	Anzahl Kolonien für die angegebene Verdünnungsstufe:					
	vor der Phageninfektion		nach der 1. Phageninfektion		nach der 2. Phageninfektion	
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
1: 1,0×10 <sup>2</sup>	≅150	19	≅100	14	≅100	7
1: 5,0×10 <sup>2</sup>	≅200	9	≅100	14	27	6
1: 2,5×10 <sup>3</sup>	≅200	13	≅100	12	71	1
1: 1,3×10 <sup>4</sup>	≅150	23	≅100	11	23	0
1: 6,3×10 <sup>4</sup>	≅200	17	≅100	10	34	2
1: 3,1×10 <sup>5</sup>	≅150	25	≅100	19	34	3
1: 1,6×10 <sup>6</sup>	≅200	31	≅100	12	44	2
1: 7,8×10 <sup>6</sup>	≅150	26	≅100	12	57	5
1: 3,9×10 <sup>7</sup>	≅200	28	≅100	8	26	2

Für die gewählten Mischungsverhältnisse konnten auch nach zwei Phageninfektionsrunden keine Unterschiede in der Anzahl der Überlebenden zwischen Zellen, die das *EcoRV*-Wildtypenzym und solchen, die die Mutante D90A exprimierten, gefunden werden.

### 3.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität

Eine Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten, die eine veränderte DNA-Bindungsspezifität aufweisen, aber ein inaktiviertes katalytisches Zentrum enthalten, sollte durch ein weiteres Selektionssystem erreicht werden. Dazu wurde die generelle Organisation von prokaryontischen Operonen, wie sie die negative Regulation des *lac*-Operons bietet, verwendet.

Operone stellen transkriptionelle Regulationsbereiche mit einem angeschlossenen Bereich zugehöriger Strukturgene, die koordiniert exprimiert werden, dar [Garrett & Grisham, 1995]. Der *upstream* der Strukturgene gelegene eigentliche Regulationsbereich besteht aus einer Promotor- und einer Operatorsequenz, die nebeneinander liegen oder einander überlappen. Der Regulation liegen Operator-Repressor-Induktor-Wechselwirkungen zugrunde, die durch das Vorhandensein bestimmter nutritiver Faktoren bewirkt werden.

Laktose kann von *E.coli* als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Der Metabolismus dieses Disaccharides hängt von seiner Hydrolyse in die Bestandteile Glukose und Galaktose ab, die durch  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert wird. In Abwesenheit von Laktose sind in den Bakteri-



enzellen weniger als fünf Enzymmoleküle vorhanden. Steht den Zellen Laktose zur Verfügung, so kann diese die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase effektiv induzieren. Eines der Gene des *lac*-Operons ist das Strukturgen für dieses Enzym. Bei seiner vollen Induktion können bis zu 10% des Gesamtgehaltes einer Zelle dieses Protein ausmachen. Wird den Bakterien Laktose entzogen, so wird die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese reprimiert. Diese Beobachtungen veranlaßten Jacob und Monod 1961 zur Veröffentlichung des nach ihnen benannten Modells der Genregulation [Jacob & Monod, 1961].

Das *lac*-Operon besteht aus zwei transkriptionellen Einheiten. Eine Einheit besteht aus den drei Strukturgenen *lacZ* ( $\beta$ -Galaktosidase), *lacY* ( $\beta$ -Galaktosidpermease) und *lacA* (Thiogalaktosidtransacetylase), die unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und der zugehörigen Operatorsequenz stehen. Die zweite Einheit besteht aus dem Regulatorgen *lacI*, das für den *lac*-Repressor kodiert und unter der Kontrolle seines eigenen Promotors steht. Die Strukturgene werden negativ reguliert, d.h. sie werden transkribiert, bis sie durch die Bindung des *lac*-Repressors an die Operatorsequenz abgeschaltet werden. Das Protein kann in Abwesenheit von Laktose mit der DNA-Sequenz des Operators spezifisch wechselwirken, die Bindung der RNA-Polymerase am *lac*-Promotor wird auf diese Weise verhindert und die Transkription der Strukturgene unterbunden. Durch die Bindung von Laktose an den Repressor kommt es zur Konformationsänderung des Proteins, es dissoziiert vom Operator ab, und Transkription der Gene setzt ein.

Der aminoternale Teil (146 Aminosäurereste =  $\alpha$ -Untereinheit) der  $\beta$ -Galaktosidase wurde gemeinsam mit dem Regulationsbereich in viele Vektoren kloniert. In Verbindung mit geeigneten Bakterienzellen, die den carboxyterminalen Bereich des Enzymes exprimieren, kann ein funktionsfähiges Enzym gebildet werden ( $\alpha$ -Komplementation) [Ullmann *et al.*, 1967]. In Gegenwart des Induktors IPTG, einem Substratanalogon von Laktose, das nicht verstoffwechselt werden kann, und des chromogenen Substrates X-Gal bilden solche Bakterien blaue Kolonien [Horwitz *et al.*, 1964]. Eine zusätzlich in den Genbereich der  $\beta$ -Galaktosidase eingefügte *Multicloningsite* erlaubt die Insertion von DNA-Fragmenten, was zu einer Unterbrechung des Leserahmens führt. Bakterienzellen, die mit einem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, können leicht identifiziert werden, sie bilden auch unter induzierenden Bedingungen weiße Kolonien aus.

Eine dem *lac*-Repressor entsprechende Wirkung auf die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit können auch andere DNA-bindende Proteine entfalten, sofern im Promotor-Operator-Bereich entsprechende Bindungsstellen vorhanden sind. Um die Funktionalität des Systems nachzuweisen, sollten bindungsaktive, aber spaltinaktive *EcoRI*-Mutanten, wie sie bereits aus Mutageneseexperimenten hervorgegangen waren, eingesetzt werden. Dazu wurden in den *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereich GAATTC-Sequenzen eingeführt, die den Promotor auf beiden Seiten direkt flankieren. Mit dem erhaltenen Plasmid wurden Bakterienzellen transformiert, die bereits über ein Plasmid verfügten, das gezielt induziert werden konnte, um die Expression der *EcoRI*-Proteine zu bewirken. Restriktionsenzyme, die die Bindungsstellen besetzen, können als Pseudorepressoren wirken, indem sie unter geeigneten Bedingungen auch in Gegenwart von IPTG und X-Gal die Bildung blauer Kolonien verhindern.

### Deletion der *EcoRI*-Schnittstelle aus der *Multicloningsite* von pBluescriptII SK+

Da das Ausgangsplasmid (pBluescriptII SK+, 2961bp) (siehe 2.2.6.1) innerhalb seiner *Multicloningsite* über eine *EcoRI*-Schnittstelle verfügte, die für das zu entwickelnde Testsystem unerwünscht war, wurde diese unter Verwendung der Schnittstellen für *EcoRV* und *NotI* deletiert. Beide Enzyme schneiden innerhalb der *Multicloningsite*, wobei ein 42bp großes Fragment herausgetrennt wird.

Das Plasmid wurde hierfür präparativ mit *EcoRV* und *NotI* gespalten (siehe 2.3.3.2), das nach Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.3.2.1) aufgereinigte Fragment (siehe 2.3.4.1.2) mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt (siehe 2.3.3.3.1), religiert (siehe 2.3.3.4) und mit dem so erzeugten Plasmid XL1-Blue-Zellen (siehe 2.2.3) transformiert.

Aus dem Ansatz konnte lediglich ein Klon gewonnen werden, der unter für das *lacZ*( $\alpha$ )-Fragment induzierenden Bedingungen blaues Wachstum zeigte und bei der analytischen Spaltung (siehe 2.3.3.2) für die Enzyme *NotI*, *EcoRV* und *EcoRI* keine Spaltstellen mehr aufwies. Die anschließende Sequenzierung (siehe 2.3.8.1) des Bereiches hätte die in Abb. 3.12 dargestellte Basenfolge ergeben sollen.

GAC	GGT	ATC	GAT	AAG	CTT	GAT	<b>GGC</b>	CGC	CAC	CGC	GGT	GGA	GCT	CCA
CTG	CCA	TAG	CTA	TTC	GAA	CTA	<b>CCG</b>	GCG	GTG	GCG	CCA	CCT	CGA	GGT
<i>EcoRV</i> -Halbseite								<i>NotI</i> -Halbseite						

Abb. 3.12: Sequenz der *Multicloningsite* von pBluescriptII SK+ nach Deletion ein 42bp-Fragmentes unter Verwendung der Schnittstellen für *EcoRV* und *NotI*

Die Sequenzierung ergab eine abweichende Folge, bei der die in Abb. 3.12 fett dargestellte Base fehlte. Da das *lacZ*( $\alpha$ )-Fragment jedoch offensichtlich seine Funktionalität erhalten hatte, wurde mit dem erhaltenen Plasmid weitergearbeitet. Es wird im folgenden als pBluescriptII SK+ $\Delta$ *NotI*-*EcoRV* (kurz: pBSK+ $\Delta$ NE, 2919bp) bezeichnet.

### Einführung flankierender *BbsI*-Schnittstellen in den *lacZ*( $\alpha$ )-Promotor

Der *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereich wurde im weiteren für eine anschließende Kassettenmutagenese vorbereitet, die den variablen Austausch mit Oligonukleotiden, die in diesem Bereich zusätzliche Bindungsstellen für Proteine, die dann als Pseudorepressoren wirken können, zur Verfügung stellen. Dazu wurden auf beiden Seiten des Promotors Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *BbsI* (GAAGAC (2/6)) eingeführt.

Die Modifikation auf der 3'-Seite des Promotors wurde mit Hilfe einer gezielten Mutagenese nach der *Quik change*-Methode (siehe 2.3.5.1.3) erreicht. Unter Verwendung von pBSK+ $\Delta$ NE und des Primerpaares *lacZ* 3'*Bbs* *hin* und *rück* (siehe Tab. 2.8) wurden in einer PCR-Reaktion die komplementären Plasmidstränge erzeugt und die methylierte *Template*-DNA durch *DpnI* abgedaut. Nach Hitzedenaturierung und langsamer Renaturierung der Plasmidstränge, die in jedem Einzelstrang einen zueinander versetzten *Nick* tragen, wurden TG1-Zellen (siehe 2.2.3) transformiert. Nach

Isolierung der Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.1.1) wurden einige *Bbs*I-positive Klone untersucht (siehe 2.3.8.1) und ergaben die korrekte Sequenz. Das erhaltene Plasmid wird im folgenden als pBSK+3'Bbs bezeichnet.

Die Einführung der *Bbs*I-Schnittstelle auf der 5'-Seite des Promotors wurde mit der *Closing oligo*-Mutagenese (siehe 2.3.5.1.2) durchgeführt. Dazu wurde mit den Plasmiden pBSK+ $\Delta$ NE und pBSK+3'Bbs ein *dut<sup>-</sup>ung<sup>-</sup>*-Stamm (siehe 2.2.3) transformiert und die gewonnene uracilhaltige DNA mit *Sca*I im Ampicillin-Resistenzgen linearisiert (siehe 2.3.3.2). Nach Hybridisierung mit dem Mutagenese-Oligonukleotid *lacZ* 5'Bbs und dem *Closing oligo* (siehe Tab. 2.7) wurden einzelsträngige Bereiche aufgefüllt, ligiert und mit dem Heteroduplex *dut<sup>+</sup>ung<sup>+</sup>*-Stämme transformiert. Zur Unterscheidung von der zumindest in pBSK+3'Bbs bereits vorhandenen *Bbs*I-Schnittstelle, wurde mit dem Mutagenese-Oligonukleotid zusätzlich eine *Acc*III-Schnittstelle zum *Screening* eingeführt. Markerpositive Klone wurden sequenziert (siehe 2.3.7.1). Auf diese Weise konnte sowohl das Plasmid mit einzelner 5'-seitiger *Bbs*I-Schnittstelle (pBSK+5'Bbs) als auch das 3',5'-Derivat (pBSK+3',5'Bbs) erhalten werden (Abb. 3.13).

					+1				-10				-20
GTC	TTC	CGC	TCA	CAA	TTC	CAC	ACA	ACA	TAC	GAT	CCG	GAA	GAC
CAG	AAG	GCG	AGT	GTT	AAG	GTG	TGT	TGT	ATG	CTA	GGC	CTT	CTG
	<i>Bbs</i> I							Promotor		<i>Acc</i> III			
	(GAAGAC (2/6))									(T↓CCGGA)			

Abb. 3.13: Sequenz des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotors im Bereich der 3',5'*Bbs*I-Schnittstellen

Mit den Plasmiden wurden geeignete Bakterienzellen (XL1-Blue MRF' Kan, siehe 2.2.3) transformiert und in Gegenwart von IPTG und X-Gal ihre Funktionalität überprüft und bestätigt. Für die anschließende Kassetten-Mutagenese wurde das Plasmid pBSK+3',5'Bbs eingesetzt.

### Einführung von *Eco*RI-Bindungsplätzen im *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereich von pBSK+3',5'Bbs

Unter Verwendung der beiden *Bbs*I-Schnittstellen in pBSK+3',5'Bbs wurden in den Promotorbereich des *lacZ*( $\alpha$ )-Gens eine synthetische Oligonukleotid-Kassette eingesetzt. Diese trägt zwei Bindungsstellen für *Eco*RI, die die eigentliche Promotorsequenz direkt flankieren. In nachfolgenden Untersuchungen soll die Besetzung der Bindungsstellen mit *Eco*RI-Proteinen eine der Funktion des *lac*-Repressors analoge Wirkung auf die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase haben, indem sie als Pseudorepressoren fungieren und die Ablesung des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments verhindern.

pBSK+3',5'Bbs wurde dazu präparativ mit *Bbs*I gespalten (siehe 2.3.3.2), wobei das Enzym ein 50bp großes Fragment ausschneidet. Das aufgereinigte Rahmenfragment (siehe 2.3.4.1.2) wurde mit dem hybridisierten, doppelsträngigen Kassetten-Fragment (siehe Tab. 2.9) ligiert und mit dem Produkt Zellen des Stammes XL1-Blue MRF'Kan (siehe 2.2.3) transformiert. Durch die Kassette wurden die *Bbs*I- und die *Acc*III-Schnittstellen zerstört und in diesem Bereich die ursprüngliche Wildtypsequenz regeneriert, um eine möglichst geringe Veränderung der Basenfolge

innerhalb des Promotors zu erzielen. Nach Isolierung der Plasmide (siehe 2.3.1.1.1) wurde die DNA *EcoRI*-positiver, *BbsI*-negativer Klone sequenziert (siehe 2.3.8.1) und die erwartete Sequenz verifiziert (Abb. 3.14).

					+1			-10						
GTT	ATC	CGC	TCA	CAA	TGA	ATT	CCA	ACA	TAC	GAA	TTC	GAA	GCA	
CAA	TAG	GCG	AGT	GTT	ACT	TAA	GGT	TGT	ATG	CTT	AAG	CTT	CGT	
						<i>EcoRI</i>		Promotor		<i>EcoRI</i>				

Abb. 3.14: Sequenz des *lacZ*( $\alpha$ )-Promotors im Bereich der *EcoRI*-Kassette

Mit den Plasmiden wurden in geeignete Bakterienzellen (XL1-Blue MRF' Kan, siehe 2.2.3) transformiert, deren Funktionalität in Gegenwart von IPTG und X-Gal bestätigt und eines für die nachfolgende Umsetzung des gesamten *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments in einen anderen Rahmen ausgewählt.

### Umsetzung des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments in einen p15A-Rahmen

Das *lacZ*( $\alpha$ )-Gen sollte in dem zu etablierenden Testsystem gemeinsam mit anderen Plasmiden innerhalb einer Zelle stabil gehalten werden. Dieses ist jedoch nur möglich, wenn die Replikationsursprünge der betreffenden Vektoren verschiedenen Kompatibilitätsgruppen angehören [Datta, 1979]. Dazu wurde das Fragment aus dem ursprünglichen pBSK+3',5'Bbs (ColE1-Derivat, siehe 2.2.6.1) herausgetrennt und in einen anderen Rahmen überführt.

Als Ausgangsplasmid diente zu diesem Zweck pACYC184 (siehe 2.2.6.1), das den p15A-*Ori* enthält. Dieses wurde zunächst in den *dam*<sup>-</sup>-Stamm GM1674 (siehe 2.2.3) transformiert, da eines der im folgenden einzusetzenden Restriktionsenzyme (*Bsh1365I*) methylierungssensitiv war. Aus dem nichtmethylierten Plasmid wurde anschließend unter Verwendung der Schnittstellen für *Bsh1365I* (GATN<sub>2</sub>↓N<sub>2</sub>ATC) und *Bsu15I* (AT↓CGAT) ein 2320bp großes Fragment, das den Replikationsursprung und das Chloramphenicol-Resistenzgen enthielt, herausgeschnitten (siehe 2.3.3.2) und aufgereinigt (siehe 2.3.4.1.2). Das *lacZ*( $\alpha$ )-Fragment wurde mit Hilfe von *AflIII* (A↓RYGT) und *SspI* (AAT↓ATT) aus pBSK+3',5'Bbs herausgeschnitten und isoliert (1136bp).

Beide Fragmente wurden mit *Pfu*-Polymerase aufgefüllt (siehe 2.3.3.3.1) und anschließend ligiert (siehe 2.3.3.4). Nach der Transformation von TG1 (siehe 2.2.3), wurden die Zellen auf LB/Chl-Platten in Gegenwart von IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Von den insgesamt etwa 100 Klonen, zeigten lediglich vier eine Blaufärbung. Nach Isolierung der Plasmide (siehe 2.3.1.1.1) wurde die DNA gelelektrophoretisch (siehe 2.3.2.1) auf die erwartete Größe von 3456bp untersucht, wobei drei der Klone die korrekte Länge zeigten. Nach analytischer Spaltung der DNA mit *EcoRI* wurden für diese Klone die erwarteten Spaltfragmente erhalten, gleichzeitig konnte auf diese Weise die relative Orientierung des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments zum p15A-Replikationsursprung ermittelt werden. Einer der Klone wurde ausgewählt und für die Erstellung des Selektionssystems eingesetzt, das Plasmid wird im nachfolgenden als pACYClacZRI bezeichnet.

## Zur Erstellung des Selektionssystems geeignete Bakterienstämme

Bezüglich ihrer Eignung zur Erstellung des Selektionssystems wurden folgende Bakterienstämme (siehe 2.2.3), die ein *Blue/White-Screening* erlauben, getestet:

- 71/18
- DH5( $\alpha$ )
- JM103
- TG1
- XL1-Blue MRF' Kan

Tab. 3.11 zeigt eine Übersicht der Plasmide, die gleichzeitig innerhalb einer Bakterienzelle stabil gehalten wurden.

Tab. 3.11: Übersicht der verwendeten Plasmide, die einer Zelle koexistierten

Plasmid	Größe [bp]	Ori	relevantes Gen	ind. Prom.	Resistenzen
pACYClacZRI	4244	p15A	<i>lacZ</i> ( $\alpha$ )	lac	Chl, Tet
pRIF309+(CH <sub>6</sub> )	5068	ColE1	<i>ecoRI</i> ( <i>wtEcoRI</i> , E111A, D91A)	$\lambda P_L$	Amp
pRK248	etwa 9200	RK2	<i>cltS857</i>	–	Tet

ind. Prom.: induzierbarer Promotor

Die Zellen wurden zunächst mit pACYClacZRI transformiert, auf LB/Chl-Platten in Gegenwart von IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Aus einigen der gebildeten blauen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und diese gelelektrophoretisch auf ihre korrekte Länge überprüft. Von jedem Stamm wurde ein Klon ausgewählt und dieser anschließend mit pRK248 transformiert. Die Zellen wurden auf LB/Chl/Tet-Platten in Gegenwart von IPTG und X-Gal ausplattiert und diese über Nacht bei 30°C bebrütet. Nach Überprüfung der Plasmid-DNA wurde wiederum je ein Klon ausgewählt und dieser mit einem der Expressionsplasmide für das Wildtypenzym (*wtEcoRI*) oder die Mutanten E111A beziehungsweise D91A transformiert. Das *wtecoRI*-Gen sollte dabei in den anschließenden Untersuchungen zur internen Überprüfung der Funktionalität des Plasmides bezüglich der erfolgreichen Expression der Proteine unter den jeweils gewählten Bedingungen dienen. Die Mutante E111A ist das eigentliche Testprotein, da dieses über eine dem Wildtypenzym entsprechende DNA-Bindungsaffinität verfügt, gleichzeitig in der Katalyse aber stark behindert ist. Die Mutante D91A besitzt weder eine spezifische Spalt- noch eine DNA-Bindungsspezifität. Die Zellen wurden auf LB/Chl/Tet/Amp-Platten in Gegenwart von IPTG und X-Gal ausplattiert, diese über Nacht bei 30°C bebrütet, einige der erzielten Klone auf ihren Plasmidgehalt überprüft und je einer für weitere Untersuchungen ausgewählt.

In den verschiedenen Zellen wurde die Expression der *ecoRI*-Gene induziert (siehe 2.2.12.1) und die Proteine auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 2.5.2) elektrophoretisch getrennt. Dabei waren für Zellen, die eine der beiden Mutanten exprimierten, schwache Induktionsbanden zu detektieren, während Zellen, die das Wildtypenzym exprimierten, keine erkenn-

bare Induktion zeigten. Von diesen wurde zusätzlich die Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß (siehe 2.6.1.2) bestimmt. Mit Ausnahme von TG1, die nach der Induktion lediglich eine schwache Spaltaktivität zeigten, konnte für alle untersuchten Zelltypen eine deutliche Spaltung der verwendeten  $\lambda$ -DNA gezeigt werden.

### **Beeinflußt die Induktion der Endonukleasegene die Expression des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments?**

Durch die gezielte Induktion der Endonukleasegene bei Temperaturen oberhalb von 37°C sollte die grundsätzliche Funktionalität des Testsystems überprüft werden. Die Anwesenheit der DNA-bindenden Proteine innerhalb der Zelle, sollte dabei die Expression des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments beeinflussen. Je nach Art des verwendeten Endonukleasegens wurde erwartet, daß in Gegenwart von IPTG und X-Gal bei einer Bebrütungstemperatur, die die Inaktivierung des thermosensitiven  $\lambda$ -Repressors zur Folge hatte und damit die *EcoRI*-Expression gestattete, grundsätzlich verschiedene Ergebnisse zu finden:

- (1) Zellen, welche das *EcoRI*-Wildtypenzym exprimierten, sollten keine Kolonien ausbilden. Durch die Restriktionsaktivität des Proteins wurde die zelleigene DNA zerstört, da die Bakterien über keinerlei Methyltransferaseschutz verfügten. Die Induktion von Zellen, die das *wtecoRI*-Gen enthielten, wurde daher als interne Kontrolle bezüglich einer erfolgreichen Proteinexpression eingesetzt.
- (2) Zellen, die die Mutante E111A exprimierten, verfügten über ein bindungsaktives, in seiner Spaltaktivität aber stark eingeschränktes Enzym. Die Bindung des Proteins im *lacZ*( $\alpha$ )-Promotorbereich konnte die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit verhindern, auch in Gegenwart von IPTG und X-Gal sollten solche Zellen keine blauen Kolonien ausbilden.
- (3) Zellen, die die Mutante D91A exprimierten, sollten in Gegenwart von IPTG und X-Gal weiterhin eine Blaufärbung der Kolonien zeigen. Bei dieser Enzymvariante handelte es sich um ein Protein, das über keine ausgeprägte DNA-Bindungs-fähigkeit verfügt und die Expression des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments auch in seiner Anwesenheit daher unbeeinflußt bleiben sollte.

Die Verwendung der Gene für die beschriebenen Enzyme sollte daher die Anwendbarkeit des angestrebten Selektionssystems nachweisen können. Die verschiedenen Zelltypen wurden wie unter 2.2.12.6 beschrieben angezogen, verdünnt und auf vorbereiteten LB/Antibiotika (siehe Tab. 3.11)/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C oder 37°C bebrütet. Die Ergebnisse für die vier verwendeten Stämme sind in Tab. 3.12 zusammengefaßt.

Tab. 3.12: Vergleich der Koloniezahlen und deren Farbintensität für die verwendeten Bakterienstämme

Stamm:	pRIF309+(CH <sub>6</sub> ):	Anzahl Kolonien bei Bebrütungstemperatur:		Intensität der Koloniefärbung:	
		30°C	37°C	30°C	37°C
71/18	wt <i>EcoRI</i>	≈50	0	(+)	/
	E111A	≈70	≈70	–	++
	D91A	≈30	≈50	–	++
DH5(α)	wt <i>EcoRI</i>	≈50	0	–	/
	E111A	≈40	≈40	–	(+)
	D91A	≈50	≈50	–	(+)
JM103	wt <i>EcoRI</i>	≈30	0	+	/
	E111A	≈120	≈110	(+)	++
	D91A	≈70	≈80	+	++
XL1-Blue	wt <i>EcoRI</i>	≈100	0	–	–
MRF' Kan	E111A	≈50	≈110	–	–
	D91A	≈50	≈100	–	–

Da Zellen der Stämme DH5(α) und XL1-Blue MRF' Kan im Vergleich ein deutlich langsames Wachstum zeigten und der Stamm 71/18 bei einer Inkubationstemperatur von 30°C keine ausgeprägte Färbung der Kolonien aufwies, wurden die weiteren Arbeiten mit Zellen des Stammes JM103 fortgeführt.

Da bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C kein Effekt auf die Expression des *lacZ*(α)-Fragmentes zu beobachten war, wurde versucht, durch schrittweise Erhöhung der Inkubationstemperatur um jeweils 1°C den Übergang des Wachstums der Kolonien für Zellen, die die Mutante E111A exprimierten, von der gefärbten in die farblose Form zu erreichen. Der überstrichene Temperaturbereich betrug 37-42°C. Für keine der gewählten Temperaturen konnte ein solcher Übergang erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, daß ein Teil der Zellen augenscheinlich die IPTG-Induzierbarkeit verloren hatte, was ebenfalls eine Bildung farbloser Kolonien hervorruft. Diese Beobachtung konnte nicht nur für Zellen, die von Erhaltungsplatten für die jeweiligen Versuche eingesetzt wurden, sondern auch für solche, die aus Glycerinkulturen angeimpft wurden, wiederholt gezeigt werden.

Von den erhaltenen Kolonien wurden daraufhin je drei weiße und drei blaue vereinzelt, die Plasmide zur Überprüfung ihrer Integrität isoliert (siehe 2.3.1.1.1) und gelelektrophoretisch (siehe 2.3.2.1) untersucht (Abb. 3.15).

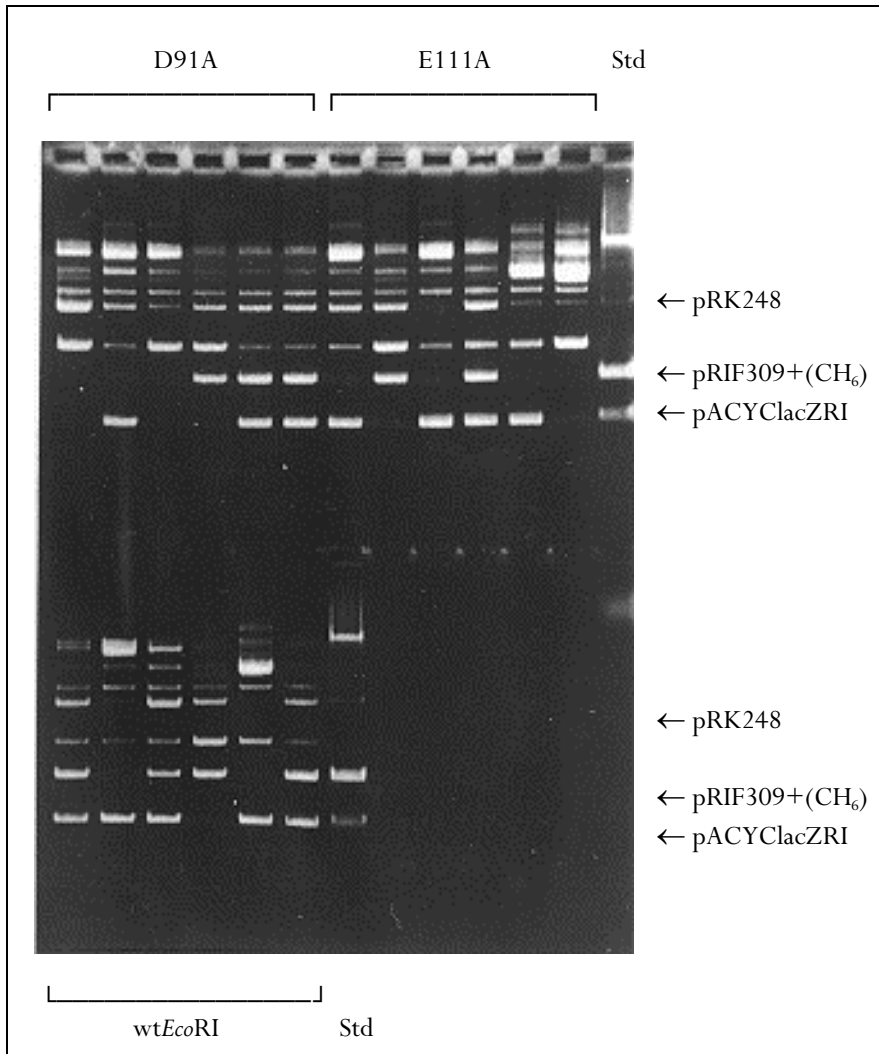


Abb. 3.15: Vergleich des Plasmidgehaltes von JM103 für jeweils sechs vereinzelte Klone

In Tab. 3.13 sind die Ergebnisse, wie sie sich für jedes der in den Zellen enthaltenen Plasmide ergaben, zusammengefaßt.



Tab. 3.13: Vergleich einzelner weißer (1-3) und blauer (4-6) Klone für JM103 bezüglich ihres Plasmidgehaltes

Mutante:	Klon:	Koloniefärbung:	pACYClacZRI:	pRK248:	pRIF309+(CH <sub>6</sub> ):
wtEcoRI	1	weiß	+	+	+
	2	weiß	+	-	-
	3	weiß	+	+	+
	4	blau	-	+	+
	5	blau	+	-	-
	6	blau	+	+	+
E111A	1	weiß	+	+	-
	2	weiß	-	+	+
	3	weiß	+	-	-
	4	blau	+	+	+
	5	blau	+	-	+
	6	blau	-	-	+
D91A	1	weiß	-	+	+
	2	weiß	+	+	-
	3	weiß	-	-	+
	4	blau	-	+	+
	5	blau	+	+	+
	6	blau	+	+	+

Mit den Klonen wurden weiterhin Induktionsversuche (siehe 2.2.12.1) durchgeführt, die in den Zellen enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2) und im *Westernblot* (siehe 2.5.3) nachgewiesen. Die Ergebnisse für die verschiedenen plasmidhaltigen Zellen sind in Tab. 3.14 zusammengefaßt. Für JM103-Zellen, die das Wildtypenzym exprimieren konnten, wurde zusätzlich die Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß bestimmt (siehe 2.6.1.2).

Tab. 3.14: Vergleich vereinzelter weißer (1-3) und blauer (4-6) Klone für JM103(pACYClacZRI, pRK248, pRIF309+(CH<sub>6</sub>))

pRIF309+(CH <sub>6</sub> ):	Klon:	drei Plasmide in korrekter Größe enthalten:	Spaltaktivität:	erkennbare Induktion:	Westernblot:
wt <i>EcoRI</i>	1	+	+	n.d.	(+)
	2	-	+	n.d.	(+)
	3	+	+	n.d.	(+)
	4	-	+	n.d.	(+)
	5	-	+	n.d.	(+)
	6	+	+	n.d.	(+)
E111A	1	-	/	+	+
	2	-	/	+	+
	3	-	/	-	(+)
	4	+	/	+	+
	5	-	/	+	+
	6	-	/	+	+
D91A	1	-	/	+	(+)
	2	-	/	-	(+)
	3	-	/	-	(+)
	4	-	/	+	+
	5	+	/	+	+
	6	+	/	+	+

n.d.: nicht detektierbar

Höchstens 50% der untersuchten Klone enthielten noch Plasmide, die in ihrer Größe der ursprünglichen Zusammensetzung entsprachen. Von den Zellen, die das *wtecoRI*-Gen enthielten, zeigten noch drei eine korrekte Plasmidzusammensetzung. Von Zellen des Stammes JM103 mit den Mutanten E111A und D91A konnten lediglich für einen beziehungsweise zwei Klone die erwarteten Plasmidgrößen nachgewiesen werden. Interessanterweise korreliert das Vorhandensein von pACYClacZRI dabei nicht mit der Koloniefärbung. Im *Westernblot* konnte für alle untersuchten Klone *EcoRI* nachgewiesen werden.

## 4.0 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zum Mechanismus der DNA-Spaltung durch *EcoRI*

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen und spalten in Gegenwart divalenter Kationen hochspezifisch DNA. Physiologischerweise nutzen die Proteine für ihre Funktion  $Mg^{2+}$ -Ionen. Zumindest *EcoRI* und *EcoRV* können in gewissem Umfang auch andere Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) zu diesem Zweck nutzen, wobei jedoch die Aktivität der Enzyme deutlich geringer ist [Woodhead *et al.*, 1981; Vipond *et al.*, 1995]. Einige Restriktionsendonukleasen (*EcoRV*, *Cfr9I*, *PaeR7*, *TaqI*) benötigen nicht nur für die Spaltung, sondern auch für die spezifische Bindung der DNA divalente Kationen. Diese Funktion kann von  $Ca^{2+}$ -Ionen übernommen werden, sie vermitteln jedoch keine Spaltung des Substrates. Mit diesem Kation ist die spezifische Spaltaktivität der Enzyme mindestens um den Faktor  $10^5$ - $10^6$  kleiner als mit  $Mg^{2+}$ .

#### 4.1.1 Nachweis einer zweiten Kationenbindungsstelle in der Nähe des katalytischen Zentrums von *EcoRI*

Kristallographische Untersuchungen an *EcoRV*-DNA-Kokristallen, in die man Schwermetallionen eindiffundieren ließ, ergaben zumindest für einige Kristalle Elektronendichten, die eine Zuordnung zweier Kationen im aktiven Zentrum des Enzyms ermöglichte [Kostrewa & Winkler, 1995]. Eine der beiden Metallionenbindungsstellen wird durch die Aminosäurereste Asp74 und Asp90, die zweite Koordinationsstelle von Glu45 gemeinsam mit Asp74 gebildet. Diese Beobachtungen führten zur Postulierung des Zwei-Metallionen-Mechanismus der Katalyse, der in Analogie zu jenem der Exonukleasedomäne der Klenowpolymerase aufgestellt wurde [Beese & Steitz, 1991]. Hierbei übernimmt eines der Metallionen die Positionierung des zu spaltenden Phosphatrestes und neutralisiert dessen negative Ladung, während ein Hydroxidion aus der schwach sauren Hydrathülle des Kations der zweiten Koordinationsstelle den nukleophilen Angriff durchführt, der letztendlich die Spaltung der Phosphodiesterbindung bewirkt [Vipond *et al.*, 1995; Kostrewa & Winkler, 1995]. Im Gegensatz dazu kommt eine substratunterstützte Katalyse mit einem einzigen Kation aus [Jeltsch *et al.*, 1993b]. Sie unterscheidet sich hauptsächlich in der Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls von der Zwei-Metallionen-Katalyse, die hierbei nicht von einem Metallion, sondern von einem Phosphatrest innerhalb der Erkennungssequenz durchgeführt wird.

Da die Bindung zweier Kationen die Anwesenheit von mindestens drei sauren Resten in geeigneter räumlicher Orientierung erfordert, wurde auch in den Kristallstrukturen von *EcoRI*,

*Bam*HI und *Pvu*II nach sauren Aminosäureresten gesucht, die eine potentiell kationenbindende Funktion erfüllen können. Das den vier Enzymen gemeinsame zentrale, fünfsträngige  $\beta$ -Faltblattmotiv, welches die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren enthält, weist in der Superposition für alle Proteine deutliche, strukturelle Übereinstimmungen auf. Die Orientierung der Reste (*Eco*RI: Asp91, Glu111, Lys113; *Eco*RV: Asp74, Asp90, Lys92; *Bam*HI: Asp94, Glu111, Glu113; *Pvu*II: Asp58, Glu68, Lys70) bezüglich der zu spaltenden Phosphodiesterbindung ist dabei identisch. Eine zu Glu45 bei *Eco*RV homologe Aminosäure konnte an der entsprechenden Position für keines der Proteine nachgewiesen werden. Es existiert jedoch in der Nähe des katalytischen Zentrums bei allen drei Enzymen jeweils ein saurer Rest in abweichender Position (*Bam*HI: Glu77, *Pvu*II: Glu55), der eine Kationenbindung möglich machen könnte (Abb. 4.1) [Cheng *et al.*, 1994].

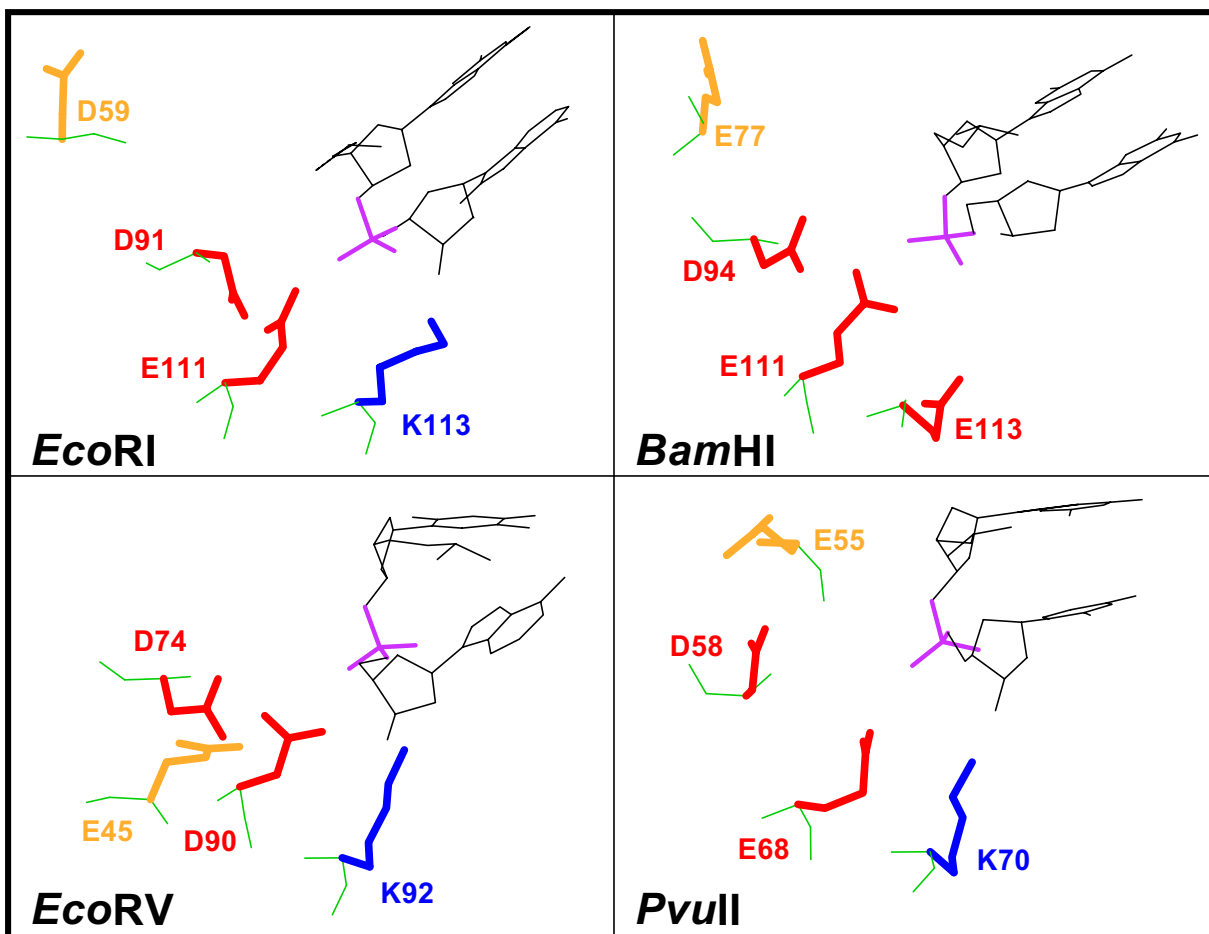


Abb. 4.1: Strukturen der katalytischen Zentren von *Eco*RI, *Eco*RV, *Bam*HI und *Pvu*II (rot beziehungsweise blau: saure Aminosäuren, deren Beteiligung an der Katalyse nachgewiesen ist; orange: saure Aminosäuren, die eventuell die Bindung eines zweiten Kations gestatten)

Bei *Eco*RI kommt für eine entsprechende Funktion die Aminosäure Asp59 in Betracht. Aufgrund der beschriebenen strukturellen Homologien von Typ II-Restriktionsendonukleasen kann angenommen werden, daß diese Enzyme einen gemeinsamen Mechanismus der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Katalyse nutzen. Ob an dieser ein (substratunterstützte Katalyse) oder mehr (Zwei-Metallionen-Katalyse) Kationen beteiligt sind, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Die in *EcoRI* enthaltenen drei Aminosäuren Asp91, Glu111 und Lys113, die die Spaltung der Phosphodiesterbindung innerhalb der Erkennungssequenz G↓AATTC vermitteln, haben sich als essentiell für die Katalyse des Proteins erwiesen [Grabowski *et al.*, 1995]. Der für die katalytische Aktivität notwendige Kofaktor  $Mg^{2+}$  wird dabei zwischen den beiden sauren Aminosäureresten positioniert. Die Bindung eines weiteren Kations wäre eventuell zwischen den Resten Asp59 und Asp91 analog zu Glu45/Asp74 bei *EcoRV* möglich.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Asparaginsäure der Position 59 durch die Aminosäurereste von Alanin (D59A), Glutaminsäure (D59E), Glycin (D59G) und Asparagin (D59N) ersetzt. Alle vier Enzyme zeigten bereits im Rohaufschluß eine ausgeprägte spezifische Spaltaktivität. Ein solches Verhalten ist für Aminosäurevarianten, bei denen für die Katalyse essentielle Aminosäuren betroffen sein sollen, nicht zu erwarten. Mutanten dieser Art besitzen im Vergleich zum Wildtypenzym typischerweise eine um den Faktor  $10^3$ - $10^4$  verringerte spezifische Spaltaktivität, die normalerweise nicht aus einem Zellaufschluß zu detektieren ist.

Die Mutanten wurden überexprimiert und affinitätschromatographisch zu einer Homogenität von etwa 95% aufgereinigt. Die ermittelten Sekundärstrukturanteile der Proteine entsprachen innerhalb der Fehlergrenzen denen des Wildtypenzyms. Wie sich bereits aus den Vorversuchen ableiten ließ, wurde die spezifische Bindungsaktivität der Mutanten nicht beeinflusst. Eine negative Ladung an der Aminosäureposition 59 ist für eine effektive DNA-Bindung anscheinend nicht notwendig. Die spezifische Bindung wird überwiegend durch Wechselwirkungen des *Extended chain*-Motivs (Aminosäurereste Met137-Ala142) mit den Basen der Erkennungssequenz vermittelt [Rosenberg, 1991; Jeltsch *et al.*, 1994b]. Dieser Bereich liegt sowohl in der Primär- als auch in der Tertiärstruktur relativ weit von der mutierten Position entfernt, eine Beeinflussung dieser Wechselwirkungen erscheint daher unwahrscheinlich.

Die spezifische Spaltaktivität der Mutante D59E entsprach jener des Wildtypenzyms, die DNA-Spaltgeschwindigkeiten der anderen drei Mutanten war höchstens um den Faktor 10 kleiner als die von *wtEcoRI*. Die homologe Mutante E45A von *EcoRV* verhielt sich in Spaltexperimenten ähnlich, so war in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen ihre Geschwindigkeit der DNA-Spaltung im Vergleich zum Wildtypenzym lediglich um den Faktor 1,8 verlangsamt [Groll *et al.*, 1997]. Dieses Ergebnis ist unter den bereits beschriebenen Voraussetzungen nicht überraschend, wenn die zu untersuchende Aminosäureposition keine essentielle Funktion in der Katalyse übernimmt. Eine negative Ladung an Position 59 von *EcoRI* wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse durch das Enzym zwar bevorzugt, denn eine Glutaminsäure kann die Asparaginsäure vollständig substituieren, jedoch ist die Anwesenheit dieser Ladung für die Funktion des Proteins von untergeordneter Bedeutung. Mutanten der Aminosäurepositionen Asp91 und Glu111, die während der Katalyse ein  $Mg^{2+}$ -Ion positionieren, erwiesen sich um mindestens den Faktor  $10^3$  weniger aktiv als das Wildtypenzym [Wolfes *et al.*, 1986; King *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989; Grabowski *et al.*, 1995]. Eine mögliche Beteiligung von Asp59 an einer für die Funktion des Enzyms wichtigen Kationenbindung kann daher ausgeschlossen werden.

Als weiterer potentiell kationenbindender Rest, der dem aktiven Zentrum ausreichend nahe kommt, könnte Glu144 fungieren. Wie sich aus der Kristallstruktur ergibt, ist diese Aminosäure in das Netzwerk der Wasserstoffbrücken von Resten beider Untereinheiten, die die Basen der Erkennungssequenz kontaktieren, involviert. Mutageneseuntersuchungen dieser Position erga-

ben keinerlei Hinweise auf eine direkte Beteiligung von Glu144 an der Katalyse [Wolfes *et al.*, 1986; Hager *et al.*, 1990; Heitman & Model, 1990; Osuna *et al.*, 1991].

Eine Zusammensetzung des katalytischen Zentrums von *EcoRI* aus zwei sauren und einer basischen Aminosäure läßt sich nicht mit einem Zwei-Metallionen-Mechanismus vereinbaren. Zumindest für die *EcoRI*-Restriktionsendonuklease ist daher die substratunterstützte Katalyse sehr wahrscheinlich. Es stellt sich die Frage, ob dieser Mechanismus, trotz der Existenz einer weiteren Metallionenbindungsstelle bei *EcoRV*, als allgemein gültig für die durch Restriktionsendonukleasen katalysierte, kationenabhängige Spaltung von Phosphodiesterbindungen angesehen werden kann. Zu ihrer Beantwortung müssen die experimentellen Ergebnisse diskutiert werden, die zur Postulierung eines Mechanismus der Katalyse durch *EcoRV*, an dem zwei Metallionen beteiligt sind, führte. Wie bereits beschrieben, konnte in einigen *EcoRV*-DNA-Kokristallen nach dem Eindiffundieren divalenter Kationen, eine zusätzliche Metallionenbindungsstelle den Resten Glu45 und Asp74 zugeordnet werden, diese war allerdings jeweils nur zu einem geringen Teil besetzt [Kostrewa & Winkler, 1995].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Restriktionsendonukleasen, benötigt *EcoRV* bereits für die spezifische Bindung seiner Erkennungssequenz divalente Kationen. Die Bildung des spezifischen Komplexes durch das Wildtypenzym konnte nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die keine anschließende Spaltung vermitteln, nachgewiesen werden [Vipond & Halford, 1995]. Bindungsaktive, aber katalytisch inaktive *EcoRV*-Mutanten bilden mit DNA nur in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen spezifische Komplexe aus [Thielking *et al.*, 1992]. Divalente Kationen sind, zumindest bei diesem Enzym, nicht nur an der Spaltung der Phosphodiesterbindung, sondern auch unmittelbar an der Ausbildung des kognaten Protein/DNA-Komplexes beteiligt. Weiterhin besteht ein synergistischer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der DNA-Spaltung und der Konzentration an Kationen, wenn Gemische aus  $\text{Mn}^{2+}$ - (vermitteln eine Spaltung) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (vermitteln keine Spaltung) verwendet werden, die nicht durch das Vorhandensein lediglich einer einzigen Kationenbindungsstelle erklärt werden können. In Gegenwart niedriger Konzentrationen an  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen (0,5mM) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (0,1-0,4mM) ließ sich die Geschwindigkeit der DNA-Spaltung stimulieren, während bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen >2mM eine Inhibition des Enzymes zu beobachten war [Vipond *et al.*, 1995].

Die Koordination eines  $\text{Mg}^{2+}$ -Ions durch Asp74/Asp90 innerhalb des katalytischen Zentrums von *EcoRV* erwies sich nicht als ausschlaggebend für die DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins, denn sowohl die Doppelmutante D74A/D90A als auch die Tripelmutante E45A/D74A/D90A zeigten weiterhin ein kationenabhängiges spezifisches DNA-Bindungsverhalten [Thielking *et al.*, 1992; Jeltsch *et al.*, 1995b]. Das kationenabhängige Bindungsverhalten wird jedoch erheblich beeinflußt, wenn die Aminosäure Tyr219 mutiert wird. Dieser Rest befindet sich jedoch im Kristall 15Å vom katalytischen Zentrum entfernt. Bei der Verwendung phosphothioatsubstituierter Oligonukleotide in Spaltexperimenten stellte sich heraus, daß für eine spezifische DNA-Bindung durch *EcoRV*, eine Kationenbindungsstelle in der Nähe des ersten Phosphatrestes innerhalb der Erkennungssequenz (GpATATC) benötigt wird [Jeltsch *et al.*, 1995b]. Dieses Phosphat befindet sich im Protein-DNA-Komplex in unmittelbarer Nähe zu Tyr219. Ein zweites Kation ist einerseits für die spezifische DNA-Bindung von *EcoRV* offensichtlich notwendig, dieses muß sich jedoch nicht zwingend an der zuletzt beschriebenen Position befinden.

Andererseits konnte auch für *EcoRV* nachgewiesen werden, daß dieses Enzym eine negative Ladung an der Phosphatgruppe, die in 5'-Richtung zur zu spaltenden Phosphodiesterbindung gelegen ist und nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse die Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls bewirkt, benötigt [Jeltsch *et al.*, 1993b]. Lediglich eine der beiden existierenden *EcoRV*-DNA-Kokristallstrukturen weist eine günstige Ausgangssituation zwischen dem zu aktivierenden Wasser und der Phosphatgruppe auf [Winkler *et al.*, 1993; Kostrewa & Winkler, 1995]. Nur in diesem Kristall wurde das verwendete Oligonukleotid nach dem Eindiffundieren von  $Mg^{2+}$ -Ionen gespalten, während die DNA des Kristalls mit der offensichtlich ungünstigen Ausgangsgeometrie intakt blieb und daher die Zuordnung der Metallionenbindungsstellen überhaupt erlaubte. Alle diese Ergebnisse zusammengenommen lassen den Schluß zu, daß auch *EcoRV* eine substratunterstützte Katalyse durchführt.

Für *BamHI* stellt sich eine etwas abweichende Situation dar. Im Gegensatz zu den anderen Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur, besteht das katalytische Zentrum dieses Enzyms aus drei sauren Resten, wobei Glu113 den Lysinresten der anderen Proteine entspricht. In der *BamHI*-DNA-Kokristallstruktur mit einem kognaten Oligonukleotid [Newman *et al.*, 1995] besetzen zwei Wassermoleküle innerhalb des katalytischen Zentrums die Positionen, an denen in der Struktur der Exonukleasedomäne der Klenowpolymerase zwei Metallionen positioniert sind [Beese & Steitz, 1991]. Ein drittes Wassermolekül befindet sich in einer für das angreifende Nucleophil günstigen Ausgangsposition. Nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse ist dieses Molekül über eine Wasserstoffbrücke mit der Phosphatgruppe in 3'-Richtung zur zu spaltenden Phosphodiesterbindung verbunden und kann in einem *In line*-Angriff aktiviert werden. Die Anwesenheit zweier Kationen im aktiven Zentrum des Enzyms ist mit beiden vorgeschlagenen Katalysemechanismen vereinbar. Eines der Ionen polarisiert das anzugreifende Phosphat, stabilisiert den Übergangszustand und führt zur Protonierung der Fluchtgruppe. Das zweite Kation aktiviert das angreifende Wassermolekül (Zwei-Metallionen-Katalyse) oder neutralisiert die negative Ladung des Übergangszustandes (substratunterstützte Katalyse).

In diesem zweiten Fall würde das Glu113 gemeinsam mit einem gebundenen  $Mg^{2+}$ -Ion in seiner Funktion einem basischen Lysinrest entsprechen. Ein solches Glu/ $Mg^{2+}$ -Paar läßt sich allerdings nicht einfach durch Lysin ersetzen, denn die *BamHI*-Mutante E113K ist ebenso katalytisch inaktiv [Dorner & Schildkraut, 1994] wie die Mutanten homologer Position von *EcoRI* (K113E) und *EcoRV* (K92E) [Grabowski *et al.*, 1995; Selent *et al.*, 1992]. Die *EcoRV*-Mutante K92E kann jedoch zu einer sehr guten DNA-Spaltung aktiviert werden, wenn  $Mg^{2+}$  durch  $Mn^{2+}$  ersetzt wird. Diese experimentellen Befunde können folgendermaßen erklärt werden: Die für *EcoRV* innerhalb des katalytischen Zentrums festgestellte zweite Kationenbindungsstelle gewinnt für die K92E-Mutante in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen an Bedeutung und kann einen Teil der Funktion übernehmen. Diese Bindungsstelle wird eventuell durch die zusätzliche saure Aminosäure stabilisiert oder verlagert. Bei *BamHI* dagegen ist die Kombination Glu113/ $Mg^{2+}$  für die katalytische Funktion von essentieller Bedeutung für das Protein. Ein Austausch gegen den größeren Lysinrest scheint aus sterischen Gründen nicht möglich zu sein. Der entsprechende Aminosäureaustausch bei *EcoRI* wird ebensowenig toleriert, da ein weiteres Kation nicht innerhalb des aktiven Zentrums untergebracht werden kann, auch wenn der Lysinrest durch eine saure Aminosäure ersetzt wurde.

Die sich aus der Superposition der an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste der Enzyme *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII* (Abb. 3.1) ergebende auffällige Übereinstimmung der Geometrie der aktiven Zentren dieser Proteine, zeigt zusätzliche Homologien in der Anordnung weiterer Strukturen. Auch die Phosphatome der zu spaltenden Phosphodiesterbindung und der ihr in 3'-Richtung benachbarten Phosphatgruppe, die nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse mit ihrem pro- $R_p$ -Sauerstoffatom die Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls bewirken soll, befinden sich an identischen Positionen [Groll *et al.*, 1997]. Dieses ist insbesondere auffällig, da einige Enzyme ihre DNA im spezifischen Komplex deutlich knicken. Das läßt jedoch den Schluß zu, daß Restriktionsendonukleasen einen gemeinsam gültigen Mechanismus der kationenabhängigen Spaltung von DNA nutzen. Aufgrund der erarbeiteten Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß es sich dabei um eine substratunterstützte Katalyse handelt.

#### 4.1.2 Veränderung der Kationenspezifität von *EcoRI*

Divalente Kationen stellen für viele Enzyme, die die Bildung oder Spaltung von Phosphodiesterbindungen in DNA oder RNA katalysieren (Polymerasen, Reparaturenzyme, Ribonukleasen, Endonukleasen), essentielle Kofaktoren dar. Kationen ermöglichen dabei die Bindung des negativ geladenen Substrates sowie die nukleophile Verschiebung während der Katalyse auftretender Ladungen [Knowles, 1980]. Die Art des genutzten Metallions differiert von Enzym zu Enzym und reicht von den Erdalkali- bis zu den Übergangsmetallen.

Die Koordination der an der Katalyse beteiligten Kationen erfolgt innerhalb des aktiven Zentrums der Enzyme und wird über saure Aminosäurereste vermittelt. Am Beispiel der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Ribonuklease H konnte nachgewiesen werden, daß es möglich ist, durch gezielte Aminosäureaustausche ein kationenunabhängiges, katalytisch aktives Protein zu erzeugen [Casareno *et al.*, 1995]. Ribonuklease H hydrolysiert das Ribonukleotidrückgrat von RNA/DNA-Hybriden und erzeugt 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyloligonukleotide [Yang *et al.*, 1990]. Im aktiven Zentrum des Proteins sind drei saure Aminosäuren enthalten (Asp10, Glu48, Asp70), wobei aufgrund der Kristallstruktur des  $Mg^{2+}$ -enthaltenden Enzyms, die Kationenbindungsstelle den Resten Asp10 und Glu48 zugeordnet werden konnte, während die dritte saure Aminosäure die Aktivierung des für die Hydrolyse notwendigen Wassermoleküls bewirkt. Der für das Enzym postulierte kationenabhängige Katalysemechanismus beinhaltet die Stabilisierung eines Reaktionsintermediates bei dem mit der Koordinationssphäre des positiv geladenen  $Mg^{2+}$ -Ions ein Komplex ausgebildet wird. Diese Beobachtung veranlaßte die Autoren dazu, die sauren Aminosäuren des katalytischen Zentrums durch basische Reste zu ersetzen. Die dadurch eingeführten positiven Ladungen sollten die Funktion eines hydratisierten Metallions übernehmen können. Die D10R/E48R-Doppelmutante erwies sich bei pH5,5 auch in Abwesenheit divalenter Kationen als katalytisch aktiv. Im Vergleich zum Wildtypenzym erreichte das Enzym eine 87%ige Spaltaktivität. Die durch die Argininseitenketten innerhalb des aktiven Zentrums erzeugte positive Ladungsdichte konnte das hydratisierte  $Mg^{2+}$ -Ion funktionell fast vollständig ersetzen.



Auch Restriktionsendonukleasen des Typs II verwenden zur spezifischen Erkennung und Spaltung von DNA bevorzugt  $Mg^{2+}$ -Ionen. Wie für *EcoRI* und *EcoRV* gezeigt wurde, können diese Enzyme auch in Gegenwart anderer Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) katalytisch aktiv sein, jedoch wird eine deutlich geringere Spaltaktivität beobachtet [Woodhead *et al.*, 1981; Vipond *et al.*, 1995]. Die Bindung und Positionierung des Kations im katalytischen Zentrum von *EcoRI* erfolgt durch die sauren Aminosäurereste Asp91 und Glu111. Um eine veränderte Kationenspezifität, also die präferenzielle Bindung anderer Kationen als  $Mg^{2+}$ , zu erreichen, wurden diese durch Cystein- oder Histidin ersetzt. Die Wahl der Substituenten beruht auf dem HSAB-Prinzip (*Principle of hard and soft acids and bases*), nach dem die Kombination weicher Lewis-Säuren mit weichen Lewis-Basen stabilere Komplexe hervorbringt als die Kombination weicher Säuren mit harten Basen [Pearson, 1969]. Exakte quantitative Voraussagen über die erreichte Komplexstabilität sind zwar nicht möglich, jedoch sollte etwa ein  $Zn^{2+}$ -Ion weichere Liganden als das Sauerstoffatom der Carboxylgruppen saurer Reste bevorzugen. Geeignete Wechselwirkungspartner sind Schwefel- oder Stickstoffatome. Die Koordination von  $Zn^{2+}$ -Ionen in Proteinen erfolgt demgemäß auch nahezu ausschließlich über Cystein- und Histidinreste [Klug & Schwabe, 1995].

Um eine Veränderung der Kationenspezifität für *EcoRI* oder analog zum oben aufgeführten Beispiel eventuell sogar eine kationenunabhängige Spaltaktivität zu erreichen, wurden die kationenbindenden Aminosäuren Asp91 und Glu111 durch Arginin, Cystein beziehungsweise Histidin ersetzt und die Einzelmutanten D91C, D91R, E111H und E111R sowie die Doppelmutanten D91C/E111C, D91H/E111H und D91R/E111R erstellt. Die ebenfalls erhaltene D91H-Einzelmutante, wurde in die Untersuchungen einbezogen. Mit Ausnahme der Mutanten E111R und D91R/E111R, für die keine ausreichend homogenen Präparationen erzielt werden konnten, wurden die Proteine überexprimiert und aufgereinigt. Die Mutanten E111C, D91C/E111H und D91H/E111C waren bereits vorhanden [Brügner, 1994], sie werden an entsprechender Stelle Berücksichtigung finden.

Für eine umfassende Charakterisierung der Proteine stand im Rahmen dieser Arbeit nicht genügend Zeit zur Verfügung, die erhaltenen Mutanten wurden daher lediglich bezüglich einer vorhandenen oder aktivierbaren spezifischen Spaltaktivität untersucht. Für D91H, D91R, E111H und D91H/E111H konnte innerhalb von 48 Stunden unter keiner der gewählten Pufferbedingungen (siehe 3.1.1) die spezifische Spaltung von DNA festgestellt werden. Ein solches Verhalten ist für Mutanten, bei denen das katalytische Zentrum verändert wurde, nicht unerwartet und mehrfach dokumentiert. Typischerweise zeigen solche Proteine im Vergleich zum Wildtypenzym eine mindestens um den Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  verringerte spezifische Spaltaktivität [Brügner, 1994; Grabowski *et al.*, 1995]. Ein einzelner Argininrest im aktiven Zentrum (D91R) kann aufgrund seiner Ladung die Bindung des Kations verhindern, gleichzeitig selbst jedoch keine ausreichende Ladungsdichte für eine effektive Katalyse zur Verfügung stellen. Die angestrebte Doppelmutante konnte zwar genetisch hergestellt, aber nicht zu ausreichender Homogenität aufgereinigt werden. Lediglich die, der Arginindoppelmutante der Ribonuklease H entsprechende *EcoRI*-Mutante, könnte im aktiven Zentrum des Enzyms eine dem gebundenen, hydratisierten  $Mg^{2+}$ -Ion entsprechende Ladungsverteilung aufweisen. Der Raumbedarf zweier Argininreste ist allerdings im Vergleich zu dem der sauren Aminosäuren erheblich größer, so

daß sterische Behinderungen der Reste innerhalb des katalytischen Zentrums wahrscheinlich sind.

Die Histidinreste an den Positionen 91 und/oder 111 konnten auch in Gegenwart anderer Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  oder  $Co^{2+}$ ) keine Aktivierung der Mutanten bewirken. Die nach dem HSAB-Prinzip mögliche stabilere Komplexbildung mit  $Zn^{2+}$ -Ionen konnte nicht nachgewiesen werden. Es gibt keinen Grund dafür, daß die von  $Mg^{2+}$  in der Katalyse wahrgenommenen Funktionen nicht auch von  $Zn^{2+}$ -Ionen ausgeführt werden können, da diese Ionen vergleichbare Ladungs-/Radius-Verhältnisse besitzen. Nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse chelatiert es als Lewisäure die nichtbindenden Sauerstoffatome der reaktiven Phosphatgruppe und steigert auf diese Weise die Elektrophilie des Phosphoratoms. Weiterhin stellt es aus seiner Koordinationssphäre ein Wassermolekül zur Verfügung, das die Fluchtgruppe protoniert und deren Abspaltung erleichtert. In der Katalyse der Carboxypeptidase A übernimmt beispielsweise ein  $Zn^{2+}$ -Ion die Polarisierung der Peptidbindung und erhöht die Elektrophilie des Kohlenstoffatoms. Ein Wassermolekül aus der Koordinationssphäre protoniert die Aminogruppe und ermöglicht die Spaltung der Bindung [Makinen *et al.*, 1984].

Der  $pK_A$ -Wert der Histidinseitenkette liegt je nach ihrer Umgebung im Bereich zwischen 6,0 und 7,0. Die gewöhnlich verwendeten Spaltpuffer liegen in ihrem pH-Wert oberhalb 7,0 (Standard- und Mangan-Spaltpuffer: pH7,5; Niedrigsalz-Spaltpuffer: pH8,8). Das Einstellen eines sauren pH-Wertes und die damit verbundene Ionisierung der Histidinseitenketten würde die Kationenbindung verhindern. Gleichzeitig ist jedoch vorstellbar, daß die nun vorhandenen positiven Ladungen eine Metallionenbindung überflüssig machen und auf diese Weise ein hydratisiertes Kation imitiert wird, was funktionell der Arginindoppelmutante entsprechen würde. Im pH-Wertbereich zwischen 5,4 und 7,0 ließ sich jedoch für keine der Mutanten eine spezifische DNA-Spaltung beobachten.

Im Gegensatz zu den Histidinvarianten von *EcoRI* wiesen zumindest die cysteinhaltigen Einzelmutanten D91C und E111C spezifische DNA-Spaltaktivität auf. Die Mutante D91C ist das erste Beispiel einer Veränderung dieser Aminosäureposition, die die Funktionalität des Proteins, wenn auch zu einem geringen Teil, erhält. Der Ersatz der Asparaginsäure durch das korrespondierende Säureamid (D91N) oder Alanin (D91A) ergab keine zu einer DNA-Spaltung befähigten Enzyme [Grabowski *et al.*, 1995]. Für Mutanten der Position 111 hingegen konnte gezeigt werden, daß sich Aminosäureaustausche nicht ganz so drastisch auf die katalytische Aktivität auswirken. Die Mutanten E111A und E111Q konnten im Vergleich zum Wildtypenzym mit einer um den Faktor 10.000 verringerten Geschwindigkeit DNA spezifisch spalten [Grabowski *et al.*, 1995]. Der Austausch beider sauren Aminosäurereste durch Cystein in der Doppelmutante D91C/E111C ergab weder unter Standard- noch *Star*-Spaltbedingungen ein aktives Protein. Diese Enzymvariante wurde allerdings im Vergleich zu den anderen Präparationen lediglich zu einer geringen Konzentration aufgereinigt, so daß eine spätere Isolierung aus dem 10l-Maßstab nicht zu umgehen sein wird, damit die zu erwartende noch schwächere katalytische Aktivität überhaupt nachgewiesen werden kann.

Ein Cysteinrest an der Position 91 kann zumindest teilweise die Funktion der Asparaginsäure übernehmen. Dazu sind besondere Pufferbedingungen notwendig, denn in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen vermochte das Enzym  $\lambda$ -DNA nicht zu spalten. Die Verwendung von  $Mn^{2+}$ -Ionen im Ansatz bewirkte eine Aktivierung, jedoch war das Protein auch innerhalb langer Inkubationszeiträume

nicht in der Lage, das verwendete Substrat vollständig umzusetzen. Eine Erhöhung des pH-Wertes im Reaktionsansatz bewirkte ebenfalls eine Aktivierung der Mutante. D91C war dann zu einer spezifischen Spaltung auch in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen befähigt, allerdings war dieser Effekt deutlich schwächer als die durch  $Mn^{2+}$ -Ionen beobachtbare Aktivierung.

Sowohl die Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ -Ionen als auch alkalische pH-Werte bei gleichzeitig niedriger Ionenstärke stellen für das Wildtypenzym sogenannte *Star*-Bedingungen dar, bei denen auch Sequenzen, die in einer Base von der kanonischen Erkennungssequenz abweichen, gespalten werden. Die Spaltung solcher Sequenzen erfolgt dabei mindestens um den Faktor  $10^3$  langsamer als die der spezifischen Sequenz. Unter den genannten Bedingungen relaxiert die ansonsten strikte Kopplung zwischen spezifischer Erkennung und der Katalyse, die die hohe Spezifität des Enzyms bedingt. Dadurch ist bereits bei einer nicht vollständigen Ausbildung aller möglichen Wechselwirkungen des Proteins mit seiner kognaten Sequenz eine Spaltung möglich. Die Geschwindigkeit der Spaltung der spezifischen Sequenz nimmt dabei deutlich ab, während *Star*-Sequenzen unter solchen Bedingungen nun mit nahezu derselben Geschwindigkeit gespalten werden [Gardner *et al.*, 1982; Rosenberg & Greene, 1982].

Die Tatsache, daß D91C in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen eine deutliche Aktivierung erfährt, könnte in einer Beteiligung dieser Aminosäure nicht nur direkt an der Katalyse, sondern auch am vorgeschalteten Kopplungsprozeß begründet sein. Das durch die spezifische Erkennung gebildete Netzwerk von Kontakten zwischen Protein und DNA bewirkt letztlich die Aktivierung des katalytischen Zentrums. In der anschließenden Kopplung werden die für die Spaltung der Phosphodiesterbindung verantwortlichen Aminosäurereste in eine für die Katalyse günstige Position gebracht. Die dazu notwendige Änderung der Gesamtstruktur des Enzyms wird möglicherweise auch durch die katalytisch aktive Aminosäure Asp91 vermittelt. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für andere *EcoRI*-Mutanten, die an der Kopplung beteiligt sind, beobachtet. Sowohl die Mutante Q115A als auch die Mutante Q115E erwiesen sich bei Verwendung des Standard-Spaltpuffers als katalytisch inaktiv, wohingegen in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ -Ionen oder bei niedriger Ionenstärke eine zum Teil drastische Aktivierung der Enzyme bewirkt wurde [Jeltsch *et al.*, 1993a].

Die DNA-Bindung ist abhängig von der Ionenstärke. Eine Aktivierung der Mutante D91C könnte unter entsprechenden Pufferbedingungen auf eine verbesserte Substratbindung zurückzuführen sein. Innerhalb dieser Arbeit blieb jedoch für eine nähere Charakterisierung der DNA-Bindungsfähigkeit keine Zeit. Es konnten allerdings für andere Mutanten der Aminosäureposition Asp91 nur sehr geringe Assoziationskonstanten bestimmt werden [Grabowski, 1993], was die Vermutung zuläßt, daß auch D91C schlecht an DNA bindet. Die durch eine Erhöhung des pH-Wertes verursachte Aktivierung des Enzyms könnte auf einer Ionisierung des eingeführten Cysteins beruhen. Der  $pK_A$ -Wert der Cysteinseitenkette liegt zwischen 9,0 und 9,5, der verwendete *Star*-Spaltpuffer hatte einen pH-Wert von 8,8. Die durch eine Deprotonierung der Sulfhydrylgruppe des Cysteins entstehende negative Ladung, könnte eine effektivere Bindung des  $Mg^{2+}$ -Ions gestatten und so die Katalyse ermöglichen.

Im Vergleich zu D91C wies die Mutante E111C eine deutlich höhere Spaltaktivität auf. Das Enzym war in der Lage, in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen bei pH7,5 DNA spezifisch zu spalten. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 8,8 im ansonsten unveränderten Puffer bewirkte eine zusätzliche

Aktivierung um etwa den Faktor 2. Die Doppelmutanten D91C/E111H und D91H/E111C zeigten sogar ausschließlich bei alkalischem pH-Wert eine geringe katalytische Restspaltaktivität [Brügner, 1994]. Für diese Aktivierung kann die bereits diskutierte Deprotonierung der Cysteinseitenkette verantwortlich sein. Eine gleichzeitige Beteiligung von E111C an Kopplung und Katalyse scheint nicht zu bestehen, da das Enzym in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen bei pH7,5 keine spezifische Spaltaktivität aufwies [Brügner, 1994].

Überraschenderweise war es nicht möglich, den vollständigen Umsatz des Substrates durch das Protein zu detektieren. Gleichzeitig fiel jedoch auf, daß die initiale Spaltung der DNA schnell einsetzte und das dann erreichte, nahezu vollständige Spaltmuster über lange Zeit unverändert blieb. Diese Beobachtung läßt sich durch verschiedene Ursachen, die eine Inaktivierung des aktiven Zentrums oder des Gesamtproteins zur Folge haben, erklären. Ein möglicher Grund ist die im Laufe einer Spaltkinetik einsetzende Oxidation des im aktiven Zentrum des Enzyms eingeführten Cysteinrestes durch Luftsauerstoff. Eine solche Oxidation kann zum Beispiel durch DTT im Reaktionsansatz verhindert werden. Spaltreaktionen, die in Gegenwart von DTT durchgeführt wurden, ergaben allerdings keine Hinweise auf eine Veränderung des Cysteinrestes, da E111C auch unter diesen Bedingungen keinen vollständigen Umsatz zeigte. Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung des Proteins besteht in seiner Denaturierung. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Protein eine einstündige Vorinkubation in Spaltpuffer bei 37°C ohne sichtbaren Aktivitätsverlust übersteht. Die anschließend durchgeführte Kinetik lieferte keine Unterschiede im Vergleich zu einer Reaktion, deren Enzym nicht vorinkubiert wurde.

Der Versuch, diese Phänomene durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration im Reaktionsansatz zu beseitigen, ergab weitere Auffälligkeiten. In Gegenwart hoher Enzymkonzentrationen (10 bis 100facher molarer Überschuß im Vergleich zur DNA) trat eine Hemmung des Proteins auf. Günstige Bedingungen für eine weitestgehende Spaltung der eingesetzten DNA ergaben sich für das Enzym nur dann, wenn etwa equimolare Verhältnisse bezüglich der Konzentration an vorhandenen *Eco*RI-Schnittstellen und der Proteinkonzentration eingestellt wurden. Bei hohen Enzymkonzentrationen gelangen größere Mengen Glycerin aus den Präparationen in die Reaktionsansätze. Eine dadurch verursachte Hemmung der Mutante E111C konnte ausgeschlossen werden, da der Zusatz von 0,5% (v/v) Glycerin zu Kinetiken keine erkennbare Beeinflussung der Spaltgeschwindigkeit zeigte.

Es erwies sich, daß das Enzym mit DNA stabile spezifische Komplexe ausbildet, die auch während einer nativen Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhalten blieben und als solche detektiert werden konnten, obwohl während der 30minütigen Vorinkubationszeit in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen eine Spaltung möglich gewesen wäre. In Gelretardationsexperimenten konnte eine durch E111C vermittelte, besonders starke DNA-Bindung in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen nicht nachgewiesen werden. Die Gegenwart dieser Kationen verbesserte die DNA-Bindungsfähigkeit jedoch deutlich [Brügner, 1994]. Die Ausbildung stabiler Protein/DNA-Komplexe wurde auch für andere Mutanten der Position 111 nachgewiesen. Sowohl E111A als auch E111Q vermochten in Gelretardationsexperimenten DNA mindestens so gut wie das Wildtypenzym zu binden [Grabowski *et al.*, 1995].

Die dem Enzym verbliebene starke spezifische DNA-Bindungsfähigkeit könnte die Hemmung in Gegenwart hoher Enzymkonzentrationen begründen, wenn innerhalb der Präparation infolge von

Aufreinigungsartefakten, zwei unterschiedliche Enzymformen existieren. Eine katalytisch inaktive Form, die DNA aber unverändert gut zu binden vermag und eine weitere Form, die neben der Bindung auch eine Spaltung durchführen kann. Die Besetzung kognater Sequenzen mit einem inaktiven Protein verhindert deren Spaltung, da aufgrund der anscheinend hohen spezifischen Bindungsaffinität das Enzym nicht durch seine katalytisch aktive Variante verdrängt werden kann. Die Möglichkeit einer kovalenten Bindung an die DNA konnte nicht nachgewiesen werden, da in denaturierenden Polyacrylamidgelen keine stabilen Protein/DNA-Komplexe beobachtet werden konnten.

Die in dieser Arbeit angefertigten Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI*, die Varianten der Aminosäurepositionen 91 und 111 des katalytischen Zentrums darstellen, fügen sich in ihren Eigenschaften in bereits untersuchte Mutanten derselben Position ein [Brügner, 1994; Grabowski *et al.*, 1995]. Dabei ist zu bemerken, daß mit der Mutante D91C das erste noch spaltaktive Enzym dieser Position isoliert wurde. Da Asp91 möglicherweise nicht nur direkt an der Katalyse, sondern auch am Kopplungsprozeß beteiligt ist, ist eine stärkere Beeinflussung des Proteins durch Variation dieser Aminosäure nicht verwunderlich. Die untersuchten Mutanten der Position erwiesen sich im allgemeinen als katalytisch inaktiv und verfügten über eine geringe DNA-Bindungsaffinität. Im Gegensatz dazu toleriert die Position 111 in gewissem Ausmaß auch andere Aminosäuren als das hier verwendete Cystein. Auch die Mutanten E111A und E111Q zeigten eine, wenn auch geringe, Restspaltaktivität. Die DNA-Bindungsaffinität dieser Enzyme blieb dahingegen unbeeinflußt. Auch die bereits untersuchten Doppelmutanten D91C/E111C und D91H/E111C wiesen noch eine sehr geringe katalytische Aktivität auf, obwohl in diesem Fall auch die kritischere Position 91 verändert wurde. Eine gleichzeitige Veränderung der Position 111 scheint die drastische Beeinflussung durch Mutationen der Position 91 zum Teil kompensieren zu können. Da im Rahmen dieser Arbeit die erstellten Mutanten lediglich hinsichtlich ihrer Spaltaktivität untersucht wurden, müssen Arbeiten angeschlossen werden, die eine vollständige biochemische und biophysikalische Charakterisierung ermöglichen.

## 4.2 Entwicklung von positiven *In vivo*-Selektionssystemen zur Anreicherung modifizierter *EcoRI*-Proteine

Die Verwendung positiver Selektionssysteme zur Anreicherung von Proteinvarianten mit veränderter Bindungs- oder Spaltspezifität stellt eine Möglichkeit dar, ohne eine zeitaufwendige Einzeluntersuchung isolierter Mutanten *in vivo* gezielt eine gewünschte Eigenschaft eines Enzyms anzureichern. Trotz zahlreicher Mutanten mit einzelnen Austauschungen der basenkontaktierenden Aminosäuren, ist es bislang nicht gelungen, eine Veränderung der Spezifität von Restriktionsendonukleasen zu erzielen. Vor dem Hintergrund der beschriebenen vielfältigen wechselseitigen Kontakte, die ein Protein mit seinem Substrat eingeht, erscheint es unumgänglich, zur Veränderung der Spezifität mehrere Mutationen gleichzeitig einzuführen. Ein solcher Ansatz ist erfolgversprechender, wenn gleichzeitig eine große Anzahl verschiedener Enzymvarianten in ein und demselben Testsystem untersucht werden kann.

### 4.2.1 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter Spaltspezifität

Ein Ansatz dieser Arbeit war die Entwicklung eines *In vivo*-Selektionssystems zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter Spaltspezifität. Das Wechselwirkungsnetzwerk zwischen Protein und seiner kognaten Sequenz resultiert in kooperativen Veränderungen sowohl im Enzym als auch in der DNA, die das katalytische Zentrum des Proteins in einer Kopplungsreaktion aktivieren. Daher lassen sich kaum Voraussagen bezüglich der sich ergebenden Veränderungen innerhalb dieser Struktur treffen, wenn mehrere Aminosäuren gleichzeitig verändert werden.

Die Erzeugung eines Enzyms mit einer neuen Spaltspezifität setzt die veränderte Erkennung einer abweichenden DNA-Sequenz und ihre spezifische Bindung voraus. Das bei *EcoRI* für die DNA-Bindung überwiegend verantwortliche Strukturelement ist das *Extended chain*-Motiv (Aminosäurereste Met137-Ala142). Eine zu diesem Motiv homologe Struktur existiert auch bei *MunI*. Der Vergleich von *EcoRI* mit *MunI* ergibt, wie bereits beschrieben (siehe 1.7), für die Gesamtsequenzen beider Proteine keine auffälligen Übereinstimmungen, eine Beobachtung wie sie für andere Restriktionsenzyme ebenfalls zutrifft. Bestimmte Strukturelemente jedoch, die in funktioneller wie struktureller Hinsicht homologe Funktionen übernehmen, weisen zum Teil hohe Sequenzübereinstimmungen (75-100%) auf [Siksnys *et al.*, 1994]. Das könnte darin begründet sein, daß beide Enzyme partiell überlappende Erkennungssequenzen aufweisen (*EcoRI*: GAATTC; *MunI*: CAATTG), wobei das zentrale Tetranukleotid und die Position der zu spaltenden Phosphodiesterbindung identisch sind. Die Unterschiede in der Erkennung der spezifischen Sequenz beziehen sich lediglich auf die äußeren Basen der Hexanukleotidsequenz, bei denen lediglich das G und das C vertauscht sind. Die Diskriminierung der äußeren Basen wird bei *EcoRI*

durch die Aminosäuren Met137, Ala138, Arg200 und Arg203 bewerkstelligt, diese sind bei *MunI* nicht konserviert.

Unter diesen Voraussetzungen scheint es sinnvoll, die Veränderung der Spezifität von *EcoRI* in Richtung der *MunI*-Erkennungssequenz zu lenken. Es wurde in unserem Labor bereits versucht, das *Extended chain*-Motiv von *EcoRI* durch jenes von *MunI* zu ersetzen. Da auf diese Weise kein aktives Enzym erhalten werden konnte (Daten nicht veröffentlicht), soll mit Hilfe eines Anreicherungssystems eine Veränderung der Spezifität erreicht werden. Dazu wird das plasmidkodierte, in bestimmten Teilsequenzen zufallsmutierte, *ecoRI*-Gen in Bakterienzellen gebracht und anschließend aufgrund seiner Spaltaktivität an spezifischen *MunI*-Sequenzen angereichert. Um die Zellen vor einer solchen Restriktionsaktivität zu schützen, enthalten diese die korrespondierende *MunI*-Methylase. Die Mutation des *ecoRI*-Gens kann für das zu exprimierende Protein verschiedene Konsequenzen haben: (1) Die Mutation bedeutet keine Veränderung bezüglich der Spaltaktivität. Solche Zellen sterben ab, da ihr Genom nicht durch die Methylase geschützt wird. (2) Durch die Mutation entsteht ein funktionsuntüchtiges Protein, dieses fügt den Zellen keinen Schaden zu und sie werden überleben. (3) Die Mutation hat ein aktives Enzym mit veränderter Spaltaktivität erzeugt, das angereichert werden soll. In Gegenwart der korrespondierenden Methyltransferase können die Zellen überleben.

Bei der Zufallsmutagenese von gleichzeitig sechs oder sieben Aminosäurepositionen entstehen  $6,4 \times 10^7$  beziehungsweise  $1,3 \times 10^9$  verschiedene Proteinvarianten. Mit dem zu entwickelnden Selektionssystem muß es daher möglich sein, in einer Anreicherungsrunde  $10^7$ - $10^9$  mutierte Gene zu untersuchen. Durch die Selektion müssen Zellen, die das gewünschte plasmidkodierte Gen tragen, von denen getrennt werden, die Plasmide enthalten, die für keine spaltaktive Endonuklease kodieren. Dazu werden die plasmidhaltigen Zellen mit Bakteriophagen infiziert. Überleben sollten nur solche Zellen, die diese Phagen abwehren können, indem sie sich eine eventuell vorhandene Restriktionsaktivität zu Nutze machen. Zur Verstärkung des durch die Phagen verursachten Effektes, enthalten diese zusätzlich ein Gen, das für ein toxisches Produkt kodiert und gezielt induziert werden kann (ebenfalls das Gen der Restriktionsendonuklease *EcoRI*). In der Sequenz dieses Genes sind Schnittstellen für die anzureichernde Endonukleaseaktivität enthalten, die durch das in den Zellen erzeugte Protein geschnitten werden können. Auf diese Weise wird die Virus-DNA zerstört und die Expression des toxischen Genproduktes verhindert. Zellen ohne entsprechende Restriktionsaktivität fallen dem Phagen und dem gebildeten Genprodukt zum Opfer.

Das dargestellte Selektionssystem wurde erstellt und hinsichtlich seiner grundsätzlichen Funktionalität überprüft. Eine Überprüfung ist durch die Verwendung von bereits mutierten Genen möglich, die im Labor vorhanden waren, oder freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden Plasmide verwendet, die für die spaltaktiven Wildtypenzyme sowie katalytisch inaktive Formen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV* kodierten, auf eine Zufallsmutagenese (einschließlich ihrer inhärenten Schwierigkeiten) konnte daher vorerst verzichtet werden.

Das *ecoRI*-Gen, welches als toxisches Gen in Bakteriophagen kloniert werden sollte, wurde durch gezielte Mutagenese zunächst mit Schnittstellen für *MunI* und *EcoRV* versehen, ohne dabei die Aminosäuresequenz und damit die Integrität des Genproduktes zu zerstören. Die Schnitt-

stellen sollen ermöglichen, daß das toxische Gen durch Endonukleasen entsprechender Spezifität inaktiviert werden kann (*MunI*-Schnittstellen für die zu mutierende *EcoRI*-Endonuklease, *EcoRV*-Schnittstellen zur Überprüfung des Systems mit *wtEcoRV* und deren Mutanten). Das modifizierte Gen wurde unter Verwendung eines *Linkers* in einen  $\lambda$ gt11-Vektor kloniert, um das korrekte Leseraster zu erzeugen. Von den untersuchten rekombinanten  $\lambda$ -Phagen (89 Plaques) ergaben fünf das *ecoRI*-Gen in der richtigen Orientierung bezüglich des verwendeten Promotors. Ein Phage enthielt das Gen in Verbindung mit einem *Linker*, entsprach also dem gewünschten Leseraster (P89), ein weiterer Phage enthielt drei *Linker*fragmente (P33). Beide Phagen wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Die Funktionalität des *ecoRI*-Gens wurde durch die Erzeugung lysogener Bakterienzellen nachgewiesen, wobei jedoch  $\lambda$ P33-kodierte *EcoRI* die deutlich höhere Spaltaktivität aufwies und daher für die Erstellung des Selektionssystemes verwendet wurde. Eine Verschiebung bezüglich des Leserasters klonierter Proteine in Phagensystemen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [Jacobsson & Frykberg, 1995; Sokolowski, persönliche Mitteilung]. Über 90% der durch Jacobsson und Frykberg untersuchten rekombinanten Phagen wiesen im Übergang *Insert/Vektor* eine Verschiebung des Leserasters in Richtung +1 oder -1 auf. Für diese stark bevorzugte Selektion „falscher“ Phagen kann es verschiedene Ursachen geben. Das klonierte DNA-Fragment weist ursprünglich das korrekte Leseraster auf und wird erst zu einem späteren Zeitpunkt verändert. Im Hinblick auf die erzielten Ergebnisse sind solche Ereignisse sehr unwahrscheinlich, denn es gibt keinen Grund, aus dem spätere Mutationen immer am 3'-Ende des Fragmentes auftauchen sollten. Eine mögliche Erklärung bietet jedoch das Phänomen des *Ribosomal slippage*, bei der es während der Translation zu einem „Stottern“ der Ribosomen kommt. Es ist bekannt, daß in DNA sogenannte *Slippery sequences*, bestehend aus mindestens vier identischen Basen vorkommen, die sowohl +1 als auch -1 Leserasterverschiebungen verursachen können [Atkins *et al.*, 1990]. Ebenso können Tandemcodons, die durch kleinere tRNAs erkannt werden, mit einer Frequenz von bis zu 50% ein *Ribosomal slippage* induzieren [Parker, 1988; Spanjaard & van Duin, 1988].

Um eine möglichst hohe Selektivität des Testsystems zu erreichen, ist es notwendig, in Abwesenheit von Restriktionsenzymen innerhalb von Bakterienzellen eine hohe Toxizität der rekombinanten Phagen gegenüber den verwendeten Zellen zu erzielen. Dadurch wird ermöglicht, daß auch bei einer großen Zahl untersuchter Zellen, die für das Auffinden der sehr seltenen, aktiven Mutanten benötigt werden, möglichst wenige die Phageninfektion und anschließende Expression des toxischen Genproduktes überstehen. Dazu wurden mehrere Stämme hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber  $\lambda$ gt11-Wildtyp- und  $\lambda$ P33-Phagen untersucht. In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung von rekombinanten  $\lambda$ P33-Phagen im Vergleich zum  $\lambda$ gt11-Wildtypphagen regelmäßig weniger Bakterienzellen überlebten. Eine um den Faktor 20-30 höhere Toxizität durch  $\lambda$ P33-Phagen im Vergleich zum Wildtypphagen konnte bei Verwendung von Zellen des Stammes Y1090(r) erzielt werden, bei dem die insgesamt wenigsten überlebenden Zellen zu detektieren waren. Zellen des Stammes Y1090(r) supprimieren die ansonsten defekte Lyse des  $\lambda$ gt11-Phagen durch die in ihm vorhandene *supF*-Mutation, wodurch es mit hoher Frequenz zur Lyse der Zellen kommt.

Die Bildung lysogener Zellen kann anscheinend trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden. Dieses zeigte sich insbesondere dann, wenn unveränderte  $\lambda$ gt11-Phagen in Kontrollansätzen



verwendet wurden. Je nach Länge der für die Induktion des toxischen Genproduktes auf  $\lambda$ P33-Phagen verwendeten Inkubationszeit, war das Überleben einzelner Bakterienzellen möglich. Während für den aufgeführten Stamm nach 30-90minütiger Expression des toxischen Genproduktes keine Kolonien festgestellt werden konnten (die Kontrollreaktion ohne Phagenzusatz ergab mehr als 500 Kolonien), ergaben sich nach einer zweistündigen Inkubationsdauer 15 überlebende Zellen. Nach einer Untersuchung der einzelnen gebildeten Kolonien, erwiesen sich drei als  $\lambda$ -lysogen. Möglicherweise ist eine Veränderung des klonierten *ecoRI*-Gens die Ursache, die eine Inaktivierung der ansonsten toxischen Endonuklease zur Folge hatte. Die Entstehung der zwölf anderen Kolonien ist vermutlich auf eine nicht erfolgte Infektion zurückzuführen. Der Maltosecarrier, der für die Adsorption der  $\lambda$ -Phagen benötigt wird, kann entweder mutiert oder nicht auf der Zelloberfläche der Bakterienzellen exprimiert sein. Es existieren allerdings noch weitere bakterielle Proteine, die eine Phageninfektion modulieren [Scandella, D. & Arber, W., 1974; Gschwind & Arber, 1977]. Um eine möglichst große Zahl von Zellen bereitzustellen, die über ein zumindest bezüglich des Maltosetransportes intaktes Membranprotein verfügen, wurde eine Anzucht von Y1090(r<sup>-</sup>) in einem Medium, das Maltose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, versucht. Die Vermehrung der Zellen in diesem Medium war jedoch auch unter weitestgehendem Zusatz anderer nutritiver Faktoren nicht möglich. Daher wurde für die Bakterienanzucht Maltose dem verwendeten Vollmedium zugesetzt.

Für die Überprüfung der grundsätzlichen Funktionalität des Selektionssystems wurden Gene der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV* verwendet, wobei entweder die Wildtypenzyme oder spaltinaktive Mutanten (*EcoRI*: D91A, *EcoRV*: D90A) zum Einsatz kamen. Für beide Enzyme ergaben sich dabei unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Zahl an überlebenden Zellen, wenn die Expression der in ihnen enthaltenen Endonukleasegene für mindestens 5min induziert wurde. Für das *EcoRI*-Wildtypenzym und ihre Mutante D91A wichen die erhaltenen Koloniezahlen mit beziehungsweise ohne den Zusatz von  $\lambda$ P33-Phagen höchstens um den Faktor drei voneinander ab. Die für die Kombination wt*EcoRI*/D91A auffallenden geringen Unterschiede lassen sich nicht durch eine der Mutante verbliebene DNA-Bindungsaktivität erklären. Die Bestimmung einer Bindungskonstante für dieses Protein in Gelretardationsexperimenten war nicht möglich. Die spezifische DNA-Bindungsaffinität von D91A ist im Vergleich um mindestens den Faktor  $10^4$  kleiner als jene des Wildtypenzym [Grabowski *et al.*, 1993].

Als erschwerend könnte sich erwiesen haben, daß die einzige Klonierungsstelle in  $\lambda$ gt11 eine *EcoRI*-Schnittstelle ist. Eine phagenkodierte, exprimierte *EcoRI* könnte eventuell ihr eigenes Gen aus dem Phagen genom heraustrennen und dieses somit seiner Toxizität berauben. Um diese Problematik zu umgehen, wurden, wenn möglich, methylierte, rekombinante Phagen verwendet, die in *EcoRI*-Methyltransferase-haltigen Zellen vermehrt wurden. Diese konnten aber nicht verwendet werden, wenn die Phagenrestriktion durch *EcoRI* bewerkstelligt werden sollte.

Im Vergleich zu *EcoRI*-haltigen Zellen konnten solche, die das *wtecoRV*-Gen exprimierten, die eingesetzten rekombinanten Phagen mit einer etwa zehnfach höheren Effektivität abwehren, als solche denen lediglich die Mutante D90A zur Verfügung stand. Der Versuch Zellen mit *wtecoRV*-Gen vor einem zunehmenden Hintergrund an Zellen mit D90A-Gen anzureichern, gelang nicht. Wenn Bakterienzellen eine funktionelle Endonuklease zur Verfügung hatten, konnte regelmäßig eine größere Anzahl Zellen überleben, da durch das Enzym eine Restriktion der transfizierenden

Phagen möglich war. Trotz der Tatsache, daß bei Verwendung des wt*EcoRV*-Enzyms eine Abwehr in gewissem Umfang möglich war, ist der erhaltene Effekt für die angestrebte Anwendung des Systems deutlich zu klein. Der mit diesem Enzym im Vergleich zu wt*EcoRI* erzielte Erfolg, könnte durch die größere Gesamtzahl (etwa 22) an Schnittstellen erklärt werden, die in der rekombinanten  $\lambda$ gt11-DNA für *EcoRV* existieren. Für die Phagenabwehr und Inaktivierung des toxischen Gens durch *EcoRI* stehen dagegen lediglich jene zwei Schnittstellen zur Verfügung, über welche das *ecoRI*-Gen kloniert wurde und die dieses daher flankieren.

Die Verwendung eines Restriktionsendonukleasegens, dessen Spezifität verändert werden soll und sein gleichzeitiger Einsatz als toxisches Agens in ein und demselben System, stellt eine Komplexierung des Systemes dar. Als Alternative wurde die Klonierung eines anderen toxischen Gens versucht. Unter Verwendung eines synthetischen Genes der bovinen, pankreatischen DNaseI [Worrall & Connolly, 1990] sollte zusätzlich die Toxizität der Phagen erhöht werden. Innerhalb des Versuchszeitraumes war mit diesem Ansatz allerdings noch kein Erfolg zu erzielen, was sicherlich mit der extremen zellschädigenden Wirkung des Proteins zusammenhängt [Doherty *et al.*, 1993].

Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität des Systems zu erhöhen, ist die gleichzeitige Verwendung mehrerer Bakteriophagentypen. Etwa wäre eine Anwendung rekombinanter f1-Phagen denkbar, die ebenfalls für ein toxisches Genprodukt kodieren. Solche Phagen könnten von Plasmiden mit f1-Replikationsursprung gewonnen werden, wenn diese gleichzeitig ein toxisches Gen tragen. Diese gelangen nicht über das Maltosecarrierprotein in die Zelle, sondern infizieren Zellen spezifisch über Sexpili und führen nicht zur Zellyse. In Verbindung mit einem toxischen Protein, dessen Gen durch die Phagenpartikel in die Zellen geschleust wird, sollte auch auf diesem Wege eine effektive Abtötung von Bakterienzellen möglich sein.

Mutationen die die Spezifität eines Enzyms beeinflussen, wirken sich im allgemeinen auch auf deren katalytische Aktivität aus. Die Abwehr von Bakteriophagen setzt jedoch eine gewisse Mindestaktivität voraus, die noch eine effektive Restriktion der Phagen-DNA gestattet. Es konnte gezeigt werden, daß für eine noch ausreichende Restriktion von Phagen mindestens eine Spaltaktivität von  $10^4$ U/mg Protein notwendig ist [Kiss, persönliche Mitteilung]. Die generelle Anwendbarkeit des Selektionssystems bleibt, aufgrund der in einer Zufallsmutagenese mehrerer Aminosäurepositionen sehr schnell anwachsenden Anzahl verschiedener Mutanten, begrenzt. Jedoch ist es vorstellbar, daß das System zur Optimierung eines Enzyms eingesetzt wird, welches seine Katalyse bereits mit ausreichender Effektivität durchführt. Die Aktivierung einer Wildtypspaltaktivität von Restriktionsendonukleasen ist bislang nicht ernsthaft versucht worden, aber möglich. So zeigt die *EcoRI*-Mutante M137Q eine im Vergleich zum Wildtypenzym etwa verdoppelte spezifische Spaltaktivität [Küster, persönliche Mitteilung]. Ähnliche Befunde zeigten weitere *EcoRI*-Proteine bei denen His114 durch die Aminosäurereste Serin beziehungsweise Threonin ersetzt wurde [Flores *et al.*, 1995]. Auch die Anwendung auf Mutanten, die bereits über eine veränderte DNA-Bindungsaktivität verfügen, ist vorstellbar, indem versucht wird, die Kopplungsreaktion, die das katalytische Zentrum aktiviert, dieser veränderten Bindungssituation anzupassen.

## 4.2.2 Selektionssystem zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter Bindungsspezifität

Es existieren *EcoRI*-Mutanten (E111A, E111Q), deren katalytische Aktivität stark herabgesetzt ist, die jedoch weiterhin über eine dem Wildtypenzym vergleichbare DNA-Bindungsaffinität verfügen [Wolfes *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1989]. Ausgehend von solchen Enzymvarianten soll in einem zweiten Ansatz ein Selektionssystem entwickelt werden, das eine Anreicherung von Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität ermöglicht.

Die den Proteinen verbliebene DNA-Affinität wurde dazu genutzt, diese als Pseudorepressoren fungieren zu lassen. Die transkriptionelle Regulation bestimmter Strukturgene wird natürlicherweise durch Operator-Repressor-Induktor-Wechselwirkungen vermittelt, denen die An- oder Abwesenheit bestimmter nutritiver Faktoren zugrunde liegt. Zu diesem Zweck wurde die strukturelle Organisation des prokaryontischen *lac*-Operons von *E. coli* genutzt, wobei durch die einzusetzenden *EcoRI*-Proteine eine dem *lac*-Repressor entsprechende Wirkung auf die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase erreicht werden sollte, sofern im Regulationsbereich entsprechende Bindungsstellen vorhanden sind.

Der aminoternale Bereich ( $\alpha$ -Untereinheit) der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) wurde gemeinsam mit seinem Operator-Promotorbereich kloniert und steht auf diversen Vektoren zur Verfügung. In geeigneten Bakterienzellen (*lacZ* $\Delta$ M15), die den Carboxyterminus des Enzyms exprimieren, entsteht ein funktionelles Protein ( $\alpha$ -Komplementation), dessen katalytische Aktivität *in vivo* leicht nachgewiesen werden kann [Ullmann *et al.*, 1967]. In Gegenwart des Induktors IPTG (nicht katabolisierbares Substratanalogon von Laktose) und des Chromophors X-Gal bilden die entsprechenden plasmidhaltigen Bakterien blaue Kolonien aus [Horwitz *et al.*, 1964]. Eine zusätzlich vorhandene *Multicloning*site ermöglicht die Insertion von DNA-Fragmenten, so daß sich eine Unterbrechung des Leserasters der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit ergibt. Mit einem solchen Plasmid transformierte Zellen können keine Komplementation des vollständigen Enzyms durchführen und bilden daher auch in Gegenwart von IPTG und X-Gal keine blauen Kolonien aus (*Blue/White-Screening*). Enthalten Zellen ein Plasmid mit intaktem *lacZ*( $\alpha$ )-Bereich, so bilden diese unter den oben dargestellten Bedingungen nur dann blaue Kolonien aus, sofern die Expression nicht durch andere Proteine verhindert wird, die im Promotorbereich binden und damit als Pseudorepressoren wirken.

Da sich das *ecoRI*-Gen auf einem Vektor befindet, der den ColE1-Replikationsursprung enthält und dieses gemeinsam mit einem Plasmid, das das modifizierte *lacZ*( $\alpha$ )-Gen trägt, in einer Bakterienzelle gehalten werden soll, wurde die *lacZ*( $\alpha$ )-Kassette in einen Rahmen mit p15A-Replikationsursprung umgesetzt, um eine stabile Transformation der Zellen mit beiden Plasmiden zu ermöglichen. Weiterhin wurden die Zellen mit einem Plasmid (RK2-*Ori*) transformiert, das den thermosensitiven Lambdarepressor  $\lambda$ 857 kodiert und so die gezielte Induktion des Endonukleasegens bei Temperaturen oberhalb von 37°C gewährleistet. Eine Übersicht der verwendeten Plasmide findet sich im Ergebnisteil in Tab. 3.11.

Um die grundsätzliche Funktionalität des Selektionssystems nachzuweisen, wurden zunächst bereits vorhandene *EcoRI*-Mutanten (D91A, E111A) [Grabowski *et al.*, 1993] verwendet, ohne

eine Veränderung der Bindungsspezifität erreichen zu wollen. Da die spezifische Erkennungssequenz GAATTC nicht im Regulationsbereich des *lacZ*-Gens vorhanden war, wurde diese flankierend zum Promotor eingeführt, um Bindungsstellen für *EcoRI* bereitzustellen. Gleichzeitig wurde die in der *Multicloningsite* vorhandene *EcoRI*-Schnittstelle, die zu Klonierungszwecken genutzt werden kann, deletiert, um mögliche weitere Wechselwirkungen mit dieser Sequenz auszuschließen. Die sich ergebende Sequenz des Regulationsbereichs ist im Ergebnisteil in Abb. 3.14 dargestellt.

Neben der Mutante E111A wurden auch die Gene des Wildtypenzym und der Mutante D91A eingesetzt. Je nach Art des verwendeten Endonukleasegens wird erwartet, daß in Gegenwart von IPTG und X-Gal bei einer Bebrütungstemperatur, die die Inaktivierung des thermosensitiven Lambdarepressors zur Folge hat und damit die Expression der Restriktionsenzyme gestattet, verschiedene Ergebnisse erhalten werden. Eine Expression von wt*EcoRI* hat das Absterben der Zellen zur Folge, da durch Restriktionsaktivität des Proteins die zelleigene DNA zerstört wird, denn die Zellen verfügen nicht über die *EcoRI*-Methyltransferase. Es kommt daher nicht zur Koloniebildung. Solche Bakterien konnten als interne Kontrolle der erfolgreichen Induktion eingesetzt werden. Bei der Mutante D91A handelt es sich um ein bindungs- und spaltinaktives Enzym, dessen Anwesenheit keine Beeinflussung der Koloniefärbung zur Folge haben dürfte, da die Expression der *lacZ*( $\alpha$ )-Untereinheit möglich bleibt. Zellen, die die Mutante E111A exprimieren, verfügen über ein bindungsaktives, in seiner Spaltaktivität allerdings stark eingeschränktes Enzym. Die Bindung dieses Proteins im *lacZ*-Promotorbereich sollte die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit verhindern und daher in Gegenwart von IPTG und X-Gal weiße Kolonien ausgebildet werden. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung von aktiven DNA-bindenden Proteinen von solchen ohne spezifische DNA-Bindungsaktivität möglich.

Nach der Untersuchung verschiedener Bakterienstämme, die eine  $\alpha$ -Komplementation durchführen können (Genotyp: *lacZ* $\Delta$ M15), erwiesen sich Zellen des Stammes JM103 als günstig. Bei einer Bebrütungstemperatur von 30°C (aktiver Lambdarepressor, keine Expression der Endonukleasegene) zeigten die Kolonien in Gegenwart von IPTG und X-Gal eine deutliche Blaufärbung. Bei 37°C Inkubationstemperatur wurden von Zellen, die das wt*ecoRI*-Gen enthielten, keinerlei Kolonien ausgebildet (einsetzende Inaktivierung des Lambdarepressors). Die Induktion der Mutanten D91A und E111A zeigte unter diesen Bedingungen keinen Einfluß auf die Expression der *lacZ*( $\alpha$ )-Untereinheit. JM103-Zellen, die die mutierten Gene enthielten, konnten ebenso viele Kolonien erzeugen wie bei 30°C, wobei sich keine Unterschiede in der Intensität der erhaltenen Blaufärbung zeigte. Die Inaktivierung des Lambdarepressors beginnt bei 37°C. Zumindest bei Verwendung des wt*ecoRI*-Gens führt diese Temperatur zu einer ausreichenden Expressionsrate des Enzyms, das aufgrund seiner hohen Toxizität die Zellen zum Absterben bringt (keine Koloniebildung). Für die Mutanten D91A und E111A könnte die erreichte Proteinkonzentration unter Umständen nicht genügen, um die Expression des *lacZ*( $\alpha$ )-Fragmentes vollständig zu reprimieren. Daher wurde durch eine schrittweise Erhöhung der Inkubationstemperatur im Bereich zwischen 37-42°C angestrebt, eine vollständige Inaktivierung des Repressors zu erreichen, um für Zellen, die die Mutante E111A enthalten, einen Übergang der Koloniefärbung in die farblose Form zu erzielen. Es konnte jedoch für keine der gewählten Temperaturen ein solcher Effekt erreicht werden. Bei den verwendeten Plasmiden handelt es

sich um verschiedene Derivate, die in der Zelle in Kopienzahlen von 2 bis 4 (pRK248), 15 bis 20 (pACYClacZRI) beziehungsweise 50 bis 100 (pRIF309+(CH<sub>6</sub>)) vorkommen. Die Spaltaktivität nach Überexpression des Wildtypenzym ließ sich bereits aus einem nicht aufgereinigten Zellysat eindeutig zeigen. Diese Beobachtung deutete auf eine ausreichend hohe, intrazelluläre Proteinkonzentration hin, da ansonsten der spezifische Nachweis des Enzyms vor dem Hintergrund der anderen zellulären Proteine nicht möglich gewesen wäre. Die reprimierende Wirkung DNA-bindungsaktiver *EcoRI*-Mutanten als Folge der Bindung an eine Operatorsequenz konnte bereits in einem P22-Phagensystem nachgewiesen werden, in dem die Proteine die Expression der für die Zellyse verantwortlichen Phagenproteine unterdrücken konnten [Fisher *et al.*, 1995].

Ein Teil der Zellen bildete zwar auch unter induzierenden Bedingungen weiße Kolonien aus, was jedoch nicht auf die Anwesenheit der *EcoRI*-Mutanten zurückzuführen war. Eine Untersuchung der Integrität der Plasmide von Zellen, die blaue beziehungsweise weiße Kolonien ausbildeten, ergab im Gelbild ein deutlich verändertes Bild. Höchstens 50% der untersuchten Klone enthielten noch Plasmide, die ihrer ursprünglichen Größe entsprachen. Die untersuchten Bakterienzellen konnten dabei in Gegenwart aller Antibiotika (Amp, Chl, Tet) existieren, die als Selektionsmarker zum Erhalt der Plasmide eingesetzt wurden. Die Anwesenheit des korrekten Plasmides, welches das modifizierte *lacZ*( $\alpha$ )-Fragment enthielt, korrelierte dabei nicht mit der Koloniefärbung. Mit den verschiedenen Klonen wurden Induktionsversuche zur Expression der *EcoRI*-Proteine durchgeführt und diese im *Westernblot* spezifisch nachgewiesen. Zellen, die das Wildtypenzym exprimierten, zeigten keine detektierbaren Induktionsbanden, der *Westernblot* ergab jedoch schwach gefärbte Proteinbanden. Für diese JM103 wurde zusätzlich die Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß der Zellen ermittelt. In allen Fällen konnte das aktive Enzym nachgewiesen werden, obwohl lediglich drei der insgesamt sechs untersuchten Klone eine korrekte Plasmidzusammensetzung aufwiesen. Zellen, die die Plasmide der Mutante E111A enthielten, zeigten nur in einem von sechs untersuchten Klonen die erwarteten Plasmidgrößen. Trotzdem ergaben fünf der sechs Klone im Laemmliigel detektierbare Induktionsbanden, das Protein konnte für alle Klone im *Westernblot* nachgewiesen werden. D91A-haltige Zellen ergaben in zwei von sechs Fällen eine korrekte Plasmidzusammensetzung. Vier der sechs untersuchten Klone zeigten deutliche Induktionsbanden, doch auch in diesem Fall konnte das Protein für alle Klone antikörperspezifisch nachgewiesen werden.

Die stabile Koexistenz mehrerer Plasmide ist für die betroffene Zelle offensichtlich mit Schwierigkeiten verbunden, auch wenn die Vektoren über kompatible Replikationsursprünge verfügen. Offenbar existierte ein ungewöhnlich hoher Selektionsdruck, der Zellen anreichte, deren Plasmide verändert wurden. Die beobachtete strukturelle Instabilität aller drei Plasmide, kann durch eine Insertion von DNA-Fragmenten verursacht sein, denn in allen Präparationen tauchten Banden im deutlich höheren Molekulargewichtsbereich auf. Doppelstrangbrüche in der chromosomalen DNA stimulieren in *E.coli* und Hefen nach einer Induktion des SOS-Reparatursystems die Rekombination [Szostak *et al.*, 1983; Walker, 1984]. Es konnte gezeigt werden, daß durch *in vivo EcoRI*-Spaltung von intrazellulären DNA-Substraten erzeugte Doppelstrangbrüche zur Aktivierung der SOS-Antwort führen [Heitman *et al.*, 1989]. Eine DNA-Schädigung könnte in dem erstellten System durch die Anwesenheit spaltaktiver Restriktionsenzyme hervor-

rufen worden sein. Da die Plasmidinstabilität allerdings auch beobachtet wurde, wenn die Bakterienzellen unter Bedingungen gehalten wurden, bei denen die Gene für die jeweilige Restriktionsendonuklease und das *lacZ*( $\alpha$ )-Fragment reprimiert waren, scheint diese Möglichkeit nicht die Ursache der Veränderungen zu sein. Zellen, die spaltinaktive *EcoRI*-Mutanten enthielten, zeigten dasselbe Phänomen. Außerdem sind Rekombinationsereignisse zwischen den verwendeten Plasmiden und der zellulären DNA aufgrund des seltenen Auftretens homologer Sequenzen zwischen diesen Spezies eher unwahrscheinlich. Zwischen identischen Plasmiden ist die homologe Rekombination möglich. Wenn anschließend ein eventuell zusätzlich erworbener Replikationsursprung inaktiviert wird, würden sich größere Konstrukte ergeben. Der sich daraus ergebende Vorteil für die Zellen ist jedoch nicht ohne weiteres ersichtlich.

Eine weitere Ursache der Plasmidvergrößerung wäre durch die Integration transponierbarer Elemente (Transposone) möglich. Der Vorgang der Transposition tritt bei allen daraufhin untersuchten prokaryontischen und eukaryontischen Spezies auf. Diese Ereignisse sind jedoch sehr selten, da das „Springen von Genen“ für eine betroffene Zelle lethal sein kann. Bei Prokaryonten tritt die Transposition mit einer Häufigkeit von  $10^{-4}$  bis  $10^{-9}$  pro Zellzyklus auf und wird strikt kontrolliert [Kleckner, 1981]. Sie kann also die Vergrößerung von Plasmiden begründen, erklärt aber nicht, wieso dieses Ereignis gerade in diesem Selektionssystem gehäuft auftritt. Von den insgesamt 18 untersuchten Einzelkolonien hatte lediglich ein Drittel ihre ursprüngliche Plasmidzusammensetzung beibehalten.

Ein ähnlicher Ansatz zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Anreicherung von Mutanten der Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und ihres Isoschizomers *RsrI*, die bevorzugt methylierte GAATTC-Sequenzen binden sollten, wurde unter Verwendung des Bakteriophagen P22 aus *Salmonella* versucht [Benson *et al.*, 1986]. Mit diesem System können DNA-bindungsaktive Proteine mit bestimmter Sequenzpräferenz selektiert werden, wobei das Überleben infizierter Zellen an ihre Fähigkeit ein entsprechendes Enzym zu synthetisieren gebunden ist [Maloy & Youderian, 1994]. Die zu bindende Sequenz befindet sich dabei innerhalb des Operators des Antirepressors, der die Expression der lytischen P22-Gene kontrolliert. Wird dieser Bereich durch ein Protein besetzt, kann dieses als Pseudorepressor wirken und die Expression der lytisch wirkenden Phagenproteine verhindern, wodurch die Bildung lysogener Zellen begünstigt wird. Ausgehend von der katalytisch inaktiven *EcoRI*-Mutante E111Q, deren Gen zufallsmutiert wurde, konnte ein Protein angereichert werden, das die Sequenz  $GA^{me6}ATTC$  genügend stark band, um ein lysogenes Wachstum der verwendeten Bakterienzellen zu induzieren [Fisher *et al.*, 1995].

Es ist möglich den *lacZ*( $\alpha$ )-Bereich auch in Bakteriophagen zu integrieren (siehe  $\lambda$ gt11, 2.2.6.2.1). Die aufgetretenen Phänomene der Plasmidinstabilität könnten auf diese Weise umgangen werden, denn die ansonsten verwendeten Plasmide sowohl für die Restriktionsendonucleasen als auch für die Methyltransferasen werden in unseren Händen seit Jahren stabil innerhalb von Bakterienzellen gehalten, ohne daß bisher Veränderungen der Vektoren beobachtet wurden. Es lassen sich also weitere Arbeiten zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Anreicherung von *EcoRI*-Mutanten mit veränderter DNA-Bindungsspezifität anschließen, die diesem hinsichtlich seiner Einsetzbarkeit eine gewisse Perspektive eröffnen. Zudem ist es möglich, weitere Bakterienstämme einzusetzen, in denen die dargestellten Phänomene eventuell nicht auftreten. Zum Beispiel wäre die Verwendung von Y1090(*r*)*cur8*-Zellen (siehe 2.2.3) möglich,

die keinen *lac*-Repressor mehr enthalten. Auf die Verwendung von IPTG während der Anreicherung könnte dann verzichtet werden.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß der Versuch einer Veränderung der Spezifität eines Enzyms zumeist mit einer Beeinflussung des katalytischen Zentrums einhergeht, wobei die Effekte aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten nicht voraussagbar sind. Außerdem sind die Kontakte der Basen mit der Erkennungssequenz redundant. Daraus ergibt sich, daß zu einer Veränderung des Proteins viele Aminosäurereste ausgetauscht werden müssen. Die Veränderung der DNA-Bindungsspezifität von *EcoRI* führt deshalb in aller Regel gleichzeitig zu einem dramatischen Verlust an katalytischer Aktivität. Diese muß also durch weitere, kompensatorische Mutationen wieder erhöht werden. Die dadurch entstehende Vielzahl möglicher Mutanten macht die Anwendung von Selektionssystemen, die eine gleichzeitige Untersuchung zahlreicher Proteinvarianten ermöglichen, unumgänglich. Die erarbeiteten Ergebnisse geben zumindest Phagen-Systemen gewisse Perspektiven, wenn die zu erreichende Selektions-effektivität gegen den unerwünschten Hintergrund in ausreichendem Maße gesteigert werden kann.

## 5.0 Zusammenfassungen

### 5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Mechanismus der durch Restriktionsendonukleasen des Typs II katalysierten Spaltung von Phosphodiesterbindungen in DNA am Beispiel von *EcoRI* durchgeführt und *In vivo*-Selektionssysteme zur Anreicherung von *EcoRI*-Proteinvarianten entwickelt.

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* erkennt hochspezifisch die Sequenz G↓AATTC. In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen wird die DNA an der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle gespalten. Der Vergleich von *EcoRI* mit anderen Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur (*EcoRV*, *BamHI*, *PvuII*, *Cfr10I*) ergab strukturelle Homologien in einem zentralen Strukturmotiv und eine auffallende Übereinstimmung der Lage der katalytisch bedeutsamen Aminosäurereste zur zu spaltenden Phosphodiesterbindung. Trotzdem wurden zwei verschiedene Mechanismen der DNA-Spaltung postuliert. Nach dem Modell der substratunterstützten Katalyse erfolgt die Spaltung der Phosphodiesterbindung unter Beteiligung der Phosphatgruppe, die dieser in 3'-Richtung direkt benachbart ist und einem  $Mg^{2+}$ -Ion. Nach dem Modell der Zwei-Metallionen-Katalyse dagegen wird die Spaltung unter Mitwirkung von zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen bewirkt.

Die Bindung zweier Kationen benötigt mindestens drei saure Aminosäurereste in geeigneter räumlicher Orientierung. Dazu wurde versucht, in der Nähe des katalytischen Zentrums von *EcoRI* eine zweite Kationenbindungsstelle nachzuweisen, die gegebenenfalls von den Resten Asp59 und Asp91 gebildet werden könnte. Die Mutanten D59A, D59E, D59G und D59N erwiesen sich in ihrer katalytischen Spaltaktivität im Vergleich zum Wildtypenzym höchstens um den Faktor 10 langsamer, ihre spezifische DNA-Bindung war nicht beeinflusst. Die erhaltenen Ergebnisse machen das Modell der substratunterstützten Katalyse zur kationenabhängigen Spaltung von Phosphodiesterbindungen durch Restriktionsendonukleasen als allgemein gültigen Mechanismus sehr wahrscheinlich.

Weiterhin wurde versucht, eine Veränderung der Kationenspezifität des Enzyms zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden die kationenbindenden Aminosäurereste des katalytischen Zentrums Asp91 und Glu111 durch Arginin, Cystein oder Histidin ersetzt und die entsprechenden Einzelmutanten sowie die Doppelmutanten D91C/E111C und D91H/E111H erhalten. Weder die Arginin- noch die Histidinmutanten zeigten eine Spaltaktivität. Die Verwendung anderer Kationen als  $Mg^{2+}$  ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) führte zu keiner Aktivierung der aktiven Zentren. Dagegen erwiesen sich zumindest die Cysteineinzelmutanten als katalytisch erstaunlich aktiv. Ein Cysteinrest kann teilweise die Funktion der Asparaginsäure übernehmen. D91C ist das erste Beispiel einer katalytisch aktiven Mutante dieser Position. Die erhaltenen Ergebnisse liefern Hinweise darauf, daß diese Aminosäure im Wildtypenzym nicht nur direkt an der Katalyse sondern auch an der Kopplung beteiligt ist. Die Mutante E111C war deutlich aktiver, jedoch zeigten sich in den verschiedenen Kinetiken Auffälligkeiten, die auf eine strukturelle Instabilität hinweisen.



Wie sich aufgrund der bisherigen Mutageneseversuche ergeben hat, müssen offensichtlich viele Aminosäureaustausche gleichzeitig innerhalb des Enzyms vorgenommen werden, um eine Veränderung der DNA-Spalt- oder -Bindungsspezifität zu erzielen. Das erschwert die Planung einer zielgerichteten Mutagenese. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher versucht, *In vivo*-Selektionssysteme zu entwickeln, die eine gleichzeitige Untersuchung vieler Mutanten, die einer Zufallsmutagenese entstammen, gestatten. Die Anreicherung von Proteinvarianten mit veränderter DNA-Spaltspezifität wurde mit Hilfe eines Systems angestrebt, bei dem  $\lambda$ -Phagen zum Einsatz kamen. Lediglich Zellen, die ein spaltaktives Enzym zur Verfügung haben, sollten eindringende Phagen abwehren können, wenn diese über entsprechende Spaltstellen verfügen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden  $\lambda$ gt11-Phagen mit dem *ecoRI*-Gen versehen, welches die Toxizität der eindringenden Viren gegenüber der Wirtszelle und damit die Selektivität des Systems zusätzlich erhöhen sollte. Um die Phagen in das Selektionssystem einsetzen zu können, wurde das Gen zuvor mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *MunI* versehen. Die grundsätzliche Funktionalität des Systems wurde unter Verwendung der Gene für *wtEcoRI* und *wtEcoRV* sowie spaltinaktiver Mutanten beider Enzyme nachgewiesen. Die erzielten Effekte waren für die geplante Anwendung aber viel zu klein. Die Selektion muß durch die Entwicklung weiterer Phagensysteme deutlich verstärkt werden.

Zur Anreicherung von *EcoRI*-Proteinen mit veränderter DNA-Bindungsspezifität wurde ebenfalls ein System entwickelt. Unter Verwendung des *lacZ*-Operons sollte die Selektion bindungsaktiver, spaltinaktiver Enzyme erzielt werden. Der *lac*-Promotor wurde zu diesem Zweck für eine Kassetten-Mutagenese vorbereitet, die eine wahlweise Einführung unterschiedlicher Bindungsstellen gestattete. Die Besetzung dieser Stellen durch ein Protein kann eine dem *lac*-Repressor analoge Wirkung auf die Expression des nachgeschalteten *lacZ*( $\alpha$ )-Fragments haben, auch wenn dieser aufgrund der eingestellten Bedingungen selbst keine Reprimierung bewirken kann. Die Funktionalität des Systems wurde unter Verwendung der Proteine für *wtEcoRI* und deren Mutanten D91A und E111A überprüft. Obwohl es sich zumindest bei der Mutante E111A um ein bindungsaktives Protein handelt, das katalytisch inaktiv ist, konnte unter keiner im Versuchszeitraum eingestellten Bedingung die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase- $\alpha$ -Untereinheit verhindert werden. Die sich ergebende große strukturelle Instabilität des aus drei Plasmiden aufgebauten Selektionssystems läßt eine weitere Verfolgung dieses Ansatzes sehr fraglich erscheinen.

**Schlagnworte:** *EcoRI*, Katalysemechanismus, *In vivo*-Selektionssystem

## 5.2 Abstract

In the present work the catalytic mechanism of type II restriction endonucleases was examined, using *EcoRI* as an example. Furthermore, in order to enrich protein variants of *EcoRI* *in vivo* selection systems were developed.

The *EcoRI* restriction endonuclease binds the sequence G↓AATTC with very high specificity and cleaves the DNA in the presence of  $Mg^{2+}$  ions as indicated by the arrow. Comparison of the

*EcoRI* crystal structure with those of other restriction endonucleases (i.e. *EcoRV*, *BamHI*, *PvuII*, *Cfr10I*) revealed striking structural homologies with respect to a central five stranded  $\beta$ -sheet that contains amino acid residues involved in catalysis. These residues are in a similar position relative to the scissile phosphodiester bond. Nevertheless, two different models for the hydrolytic cleavage of DNA have been proposed. Following the substrate-assisted catalysis (*EcoRI*) strand cleavage is achieved by using one  $Mg^{2+}$  ion and the phosphate group 3' next to scissile phosphodiester bond that deprotonates the attacking water molecule. In contrast, the alternatively suggested two-metal-ion mechanism (*EcoRV*) proposes two  $Mg^{2+}$  ions to be involved in hydrolysis.

Binding of two metal ions requires at least three acidic amino acid residues sterically arranged in an orientation favourable for catalysis. We tried to identify a second metal ion binding site near the catalytic centre of *EcoRI*, probably formed by amino acid residues Asp59 and Asp91. Mutant proteins D59A, D59E, D59G, and D59N, respectively, turned out to be slightly less active compared to the wildtype enzyme (factor of ten at the most). Specific DNA binding was not influenced. These results are in accordance with the substrate-assisted model for cation dependent cleavage of phosphodiester bonds catalyzed by restriction endonucleases. Probably, this mechanism is more general for these enzymes.

Furthermore, we tried to change the cation dependence of the *EcoRI* restriction enzyme. For this purpose, residues responsible for cation binding within the catalytic centre (Asp91, Glu111) were mutated. Single mutants containing arginine, cysteine, and histine, respectively, as well as double mutants D91C/E111C and D91H/E111H were isolated. Neither arginine nor histidine mutants exhibited any catalytic activity. Attempts to activate the catalytic centres of the mutant enzymes by replacing  $Mg^{2+}$  by other cations (i.e.  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) failed. In contrast, the cysteine single mutants showed remarkable catalytic activity indicating that this amino acid can partly take over the function of the acidic residues. The D91C mutant is the first protein variant at this position described that exhibits residual DNA cleavage activity. The results obtained indicate that this position is not only directly involved in catalysis, but also participates in coupling specific DNA binding to cleavage. The E111C mutant was clearly more active. But results from different kinetic experiments gave rise to a structural instability of this protein.

Taken the results of many mutagenesis experiments it became obvious that multiple amino acid substitutions have to be made in order to alter an enzymes DNA cleavage or binding specificity. This causes complex problems with regard to the prospect of success of site directed mutagenesis experiments. Therefore, second part of this work dealt with the development of *in vivo* selection systems allowing an investigation of numerous mutants derived from a random mutagenesis approach. To select protein variants with altered DNA cleavage specificity a  $\lambda$  phage based selection system was designed. Only bacterial cells that are protected by a catalytically active enzyme can restrict phages and survive an infection. For this purpose the *ecoRI* wildtype gene containing restriction sites for the *EcoRV* and *MunI* endonucleases was cloned into  $\lambda$ gt11 phages in order to increase the toxicity of the incoming virus and by this the selectivity of the system. Using plasmid encoded genes for the *EcoRI* or the *EcoRV* wildtype restriction endonucleases and catalytic inactive variants, respectively, the general functionalism of the system was proved. The effects obtained were too small to fulfill the demands of a selection system. A

more pronounced enrichment of active enzymes can probably be achieved by using additional phage systems.

For the selection of *EcoRI* proteins exhibiting an altered DNA binding specificity another system was developed. Using the *lacZ* operon proteins that can bind but not cleave DNA should be selected. The *lacZ* promoter was modified by cassette mutagenesis permitting insertion of different protein binding sites. Specific occupation of such sites should prevent expression of the *lacZ*( $\alpha$ ) fragment. The *lac* repressor is not functional under conditions chosen for this system. In order to check the system in general the *EcoRI* wildtype protein and its mutants D91A and E111A were used, respectively. At least the E111A mutant exhibits specific DNA binding but no cleavage activity but this protein could not inhibit *lacZ*( $\alpha$ ) expression under any condition examined. Although, the selection system consists of three compatible plasmids they turned out to be structurally very instable and it is questionable whether this approach should be continued in the future.

**Keywords:** *EcoRI*, catalytic mechanism, *in vivo* selection system

## 6.0 Literaturverzeichnis

Aggarwal, A.K. (1995)

Structure and function of restriction endonucleases

*Curr. Op. Struct. Biol.* **5**: 11

Alves, J., Pingoud, A., Langowski, J., Urbanke, C. & Maass, G. (1982)

Two identical subunits of the *EcoRI* restriction endonuclease co-operate in the binding and cleavage of the palindromic substrate

*Eur. J. Biochem.* **124**: 139

Alves, J., Pingoud, A., Haupt, W., Langowski, J., Peters, F., Maass, G. & Wolff, C. (1984)

The influence of sequences adjacent to the recognition site on the cleavage of oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* endonuclease

*Eur. J. Biochem.* **140**: 83

Alves, J., Rüter, T., Geiger, R., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989a)

Changing the hydrogen-bonding potential in the DNA binding site of *EcoRI* by site-directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, the preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site -GAATTC-

*Biochemistry* **28**: 2678

Alves, J., Urbanke, C., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989b)

Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* restriction endonuclease

*Biochemistry* **28**: 7879

Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotisfaki, D., Tucker, P.A. Wilson, K.S. & Kokkinidis, M. (1994)

Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*

*Nat. Struct. Biol.* **1**: 469

Atkins, J.F., Weiss, R.B. & Gesteland, R.F. (1990)

Ribosome gymnastics degree of difficulty 9.5, style 10

*Cell* **62**: 413

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987)

*Current protocols in molecular biology*

Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York

Beese, L.S. & Steitz, T.A. (1991)

Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism

*EMBO J.* **10**: 25

- Benson, N., Sugiono, P., Bass, S., Mendelman, L.V. & Youderian, P. (1986)  
General selection for specific DNA-binding activities  
*Genetics* **114**: 1
- Bertani, G. & Weigle, J.J. (1953)  
Host controlled variation in bacterial viruses  
*J. Bacteriol.* **65**: 113
- Bickle, T.A. (1993)  
The ATP-dependent restriction enzymes  
in *Nucleases* (Linn, S.M., Lloyd, R.S., Roberts, R.J., Eds): 89-109, Cold Spring Harbor, New York
- Bickle, T.A. & Krüger, D.H. (1993)  
Biology of DNA restriction  
*Microbiol. Rev.* **57** (2): 434
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
*Nucleic Acids Res.* **7**: 1513
- Bozic, D., Grazulis, S., Siksnys, V. & Huber, R. (1996)  
Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease Cfr10I at 2.15Å resolution  
*J. Mol. Biol.* **255**: 176
- Brügner, E. (1994)  
Versuch der Veränderung der Kationenspezifität des katalytischen Zentrums der Restriktionsendonuklease *EcoRI* durch zielgerichtete Mutagenese  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Casareno, R.L., Li, D. & Cowan, J.A. (1995)  
Rational redesign of a metal-dependent nuclease. Engineering the active site of magnesium-dependent ribonuclease H to form an active "metal-independent" enzyme  
*J. Am. Chem. Soc.* **117**: 11011
- Chen, Y.H., Yang, J.T. & Martinez, H.M. (1972)  
Determination of secondary structure of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion  
*Biochemistry* **22**: 4120
- Cheng, X., Balendrian, K., Schildkraut, I. & Anderson, J.E. (1994)  
Structure of *PvuII* endonuclease with cognate DNA  
*EMBO J.* **13**: 3927
- Cheng, X. (1995a)  
DNA modification by methyltransferases  
*Curr. Op. Struct. Biol.* **5**: 4

- Cheng, X. (1995b)  
Structure and function of DNA methyltransferases  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 293
- Cheng, X., Balendrian, K., Schildkraut, I. & Anderson, J.E. (1995)  
Crystal structure of the *PvuII* restriction endonuclease  
*Gene* **157**: 139
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989)  
One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. & Wingfield, P.T. (1995)  
*Current protocols in protein science*  
JohnWiley & Sons, Inc., New York
- Connolly, B.A., Eckstein, F. & Pingoud, A. (1984)  
The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI* catalyzed reaction  
*J. Biol. Chem.* **259** (17): 10760
- Datta, N. (1979)  
Plasmid classification: Incompatibility grouping  
In *Plasmids of medical, environmental and commercial importance* (Timmins, K.N. & Pühler, A., Eds):  
3, Elsevier, Amsterdam
- Doherty, A.J., Connolly, B.A. & Worrall, A.F. (1993)  
Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promotor-based vector  
*Gene* **136**: 337
- Dorner, L.F. & Schildkraut, I. (1994)  
Direct selection of binding proficient/catalytic deficient variants of *BamHI* endonuclease  
*Nucleic Acids Res.* **22** (6): 1068
- Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Boyer, H.W. & Goodman, H.M.  
Physical identity of the SV40 deoxyribonucleic acid sequence recognized by the *EcoRI* restriction endonuclease and modification methylase  
*Biochemistry* **13** (3): 503
- Ehbrecht, H.-J., Pingoud, A., Urbanke, C., Maass, G. & Gualerzi, C. (1985)  
Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA  
*J. Biol. Chem.* **260** (1): 6160
- Engel, C. (1993)  
Proteindesign zur Erweiterung der Substratspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover

- Engler, L.E., Welch, K.K. & Jen-Jacobson, L. (1997)  
Specific binding by *EcoRV* endonuclease to its DNA recognition site GATATC  
*J. Mol. Biol.* **269**: 82
- Fisher, E.W., Yang, M.-T., Jeng, S.-t., Gardner, J.F. & Gumpert, R.I. (1995)  
Selection of mutations altering specificity in restriction-modification enzymes using the bacteriophage P22 challenge-phage system  
*Gene* **157**: 119
- Flaman, J.M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S.H. & Iggo, R. (1994)  
A rapid PCR fidelity assay  
*Nucleic Acids Res.* **22**: 3259
- Flores, H., Osuna, J., Heitman, J. & Soberón, X. (1995)  
Saturation mutagenesis of His<sup>114</sup> of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants  
*Gene* **157**: 295
- Fritz, A. (1991)  
Herstellung und Charakterisierung der Mutanten N141S, A, D, Y der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Messing, J. & Shepherd, R.J. (1982)  
Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *EcoRI*<sup>\*</sup>  
*DNA* **1** (2): 109
- Garrett, R.H. & Grisham, C.M. (1995)  
*Biochemistry*  
Saunders College Publishing, USA
- Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A., Wolfes, H., Pingoud, V., Urbanke, C., Maass, G., Pingoud, A., Düsterhöft A. & Kröger, M. (1989)  
Genetic engineering of *EcoRI* 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
- Gerlt, J.A. (1993)  
Mechanistic principles of enzyme-catalyzed cleavage of phosphodiester bonds  
in *Nucleases* (Linn, S.M., Lloyd, R.S., Roberts, R.J., Eds): 1-34, Cold Spring Harbor, New York
- Gschwind, N. & Arber, W. (1977)  
Normal expression of the viral gene *N* interferes with growth of bacteriophage  $\lambda$  in *Escherichia coli* 15T<sup>-</sup>  
*Molec. gen. Genet.* **155**: 19

- Goodman, H.M., Greene, P.J., Garfinf, D.E. & Boyer, H.W. (1977)  
DNA site recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease and modification methylase  
in *Nucleic acid - protein recognition* (Vogel, E.J., Ed.): 239, Academic Press, New York
- Ghosh, S.S., Obermiller, P.S., Kwoh, T.J. & Gingeras, T.R. (1990)  
Analysis of substrate specificity of the PaeR7 endonuclease: effect of base methylation on the  
kinetics of cleavage  
*Nucleic Acids Res.* **18**: 5063
- Grabowski, G. (1993)  
Charakterisierung des aktiven Zentrums der Restriktionsendonuklease *EcoRI* mithilfe zielge-  
richtet hergestellter Mutanten  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Grabowski, G., Jeltsch, J., Wolfes, H., Maass, G. & Alves, J. (1995)  
Site-directed mutagenesis on the catalytic center of the restriction endonuclease *EcoRI*  
*Gene* **157**: 113
- Grabowski, G., Maass, G. & Alves, J. (1996)  
Asp-59 is not important for the catalytic activity of the restriction endonuclease *EcoRI*  
*FEBS Lett.* **381**: 106
- Groll, D.H., Jeltsch, A., Selent, U. & Pingoud, A. (1997)  
Does the restriction endonuclease *EcoRV* employ a two-metal-ion mechanism for DNA cleava-  
ge?  
*Biochemistry* **36**: 11389
- Hager, P.W., Reich, N.O., Day, J.P., Coche, T.G., Boyer, H.W., Rosenberg, J.M. & Greene,  
P.J. (1990)  
Probing the role of glutamic acid 144 in the *EcoRI* endonuclease using aspartic acid and gluta-  
mine replacements  
*J. Biol. Chem.* **265** (35): 21520
- Hanahan, D. (1983)  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
*J. Mol. Biol.* **166**: 557
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1972)  
DNA nucleotide sequence restricted by the *EcoRI* endonuclease  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3448
- Heitman, J., Zinder, N.D. & Model, P. (1989)  
Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the *EcoRI* endonuclease  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2281



- Heitman, J. (1992)  
How the *EcoRI* endonuclease recognizes and cleaves DNA  
*BioEssays* **14**: 445
- Heitman, J. (1993)  
On the origins, structures and functions of restriction-modification enzymes  
in *Genetic engineering* (Setlow, J.K., Ed.): 57, Plenum Press, New York
- Heitman, J. & Model, P. (1990)  
Substrate recognition by the *EcoRI* endonuclease  
*Proteins* **7**: 185
- 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
- Hofschneider, P.H. (1963)  
Untersuchungen über „kleine“ *E. coli* K12 bakteriofagen. 1. und 2. Mitteilung  
*Z. Naturforsch. B. Chem. Biochem. Biophys. Biol.* **18b**: 203
- Horwitz, J.P., Chua, J., Curby, R.J., Tomson, A.J., DaRooge, M.A., Fisher, B.E., Mauricio, J. & Klundt, I. (1964)  
Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity I. Some substituted 3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranosides  
*J. Med. Chem.* **7**: 574
- Hsu, M. & Berg, P. (1978)  
Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing  $Mg^{2+}$  with  $Mn^{2+}$   
*Biochemistry* **17**: 131
- Jacob, F. & Monod, F. (1961)  
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins  
*J. Mol. Biol.* **3**: 318
- Jacobsson, K. & Frykberg, L. (1995)  
Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display  
*BioTechniques* **18**: 878
- Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimasauskas, S. & Butkus, V. (1992a)  
Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV)  
*Nucleic Acids Res.* **20**: 6043
- Janulaitis, A., Vaisvila, R., Timinskas, A., Klimasauskas, S. & Butkus, V. (1992b)  
Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzymes  
*Nucleic Acids Res.* **20**: 6051

- Jeltsch, A., Alves, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1992)  
On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*  
*FEBS Lett.* **304**: 4
- Jeltsch, A., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993a)  
Mutational analysis of the function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis  
*J. Biol. Chem.* **229**: 221
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993b)  
Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes  
*Biochemistry* **90**: 8499
- Jeltsch, A. (1994)  
Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Untersuchungen zur Evolution, linearen Diffusion, DNA-Erkennung und zum Mechanismus der DNA-Spaltung  
Dissertation, Universität Hannover
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1994a)  
Pausing of the restriction endonuclease *EcoRI* during linear diffusion on DNA  
*Biochemistry* **33**: 10215
- Jeltsch, A., Alves, J., Urbanke, C., Maass, G., Eckstein, H., Lianshan, Z., Bayer, E. & Pingoud, A. (1994b)  
A dodecapeptide comprising the extended chain- $\alpha 4$  region of the restriction endonuclease *EcoRI* specifically binds to the *EcoRI* recognition site  
*J. Biol. Chem.* **270**: 5122
- Jeltsch, A., Pleckaityte, M., Selent, U., Wolfes, H., Siknys, V. & Pingoud, A. (1995a)  
Evidence for substrate-assisted catalysis in the DNA cleavage of several restriction endonucleases  
*Gene* **157**: 157
- Jeltsch, A., Maschke, H., Selent, U., Wenz, C., Köhler, E., Connolly, B.A., Thorogood, H. & Pingoud, A. (1995b)  
DNA binding specificity of the *EcoRV* restriction endonuclease is increased by  $Mg^{2+}$  binding to a metal binding site distinct from the catalytic center of the enzyme  
*Biochemistry* **34**: 6239
- Jen-Jacobson, L., Engler, L.E., Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R., Yee, C. & McVerry, B. (1996)  
Structural adaptations in the interaction of *EcoRI* endonuclease with methylated GAATTC sites  
*EMBO J.* **15**: 2870
- Johnson, W.J. (1988)  
Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy  
*Anv. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**: 145

- Johnson, W.J. (1990)  
Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide  
*Proteins* **7**: 205
- Jost, J.P. & Saluz, H.P. (1993)  
*DNA methylation: molecular biology and biological significance*  
Birkhäuser Verlag, Basel
- Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J. & Rosenberg, J.M. (1990)  
Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing  
*Science* **249**: 13307
- King, K., Benkovic, S.J. & Modrich, P. (1989)  
Glu-111 is required for activation of the DNA cleavage of *EcoRI* endonuclease  
*J. Biol. Chem.* **264** (20): 11807
- Kleckner, N. (1981)  
Transposable elements in prokaryotes  
*Annu. Rev. Genet.* **15**: 341
- Klug, A. & Schwabe, J.W.R. (1995)  
Zinc fingers  
*FASEB J.* **9**: 597
- Knowles, J.R. (1980)  
Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions  
*Ann. Rev. Biochem.* **49**: 877
- Kostrewa, D. & Winkler, F.K. (1995)  
 $Mg^{2+}$  binding to the active site of *EcoRV* 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. & 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. & Schroeder, C. (1995)  
The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral genomes  
*FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 177
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* **227**: 680

- Lagunavicius, A., Grazulis, S., Balciunaite, E., Vainius, D. & Siksnys, V. (1997)  
DNA binding specificity of *MunI* restriction endonuclease is controlled by pH and calcium ions: involvement of active site carboxylate residues  
*Biochemistry* **36** (37): 11093
- Lagunavicius, A. & Siksnys, V. (1997)  
Site-directed mutagenesis of putative active site residues of *MunI* restriction endonuclease: replacement of catalytically essential carboxylate residues triggers DNA binding specificity  
*Biochemistry* **36** (37): 11086
- Lane, A.N., Jenkins, T.C., Brown, T. & Neidle, S. (1991)  
Interaction of berenil with the *EcoRI* dodecamer d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> in solution studied by NMR  
*Biochemistry* **30**: 1372
- Langowski, J., Pingoud, A., Goppelt, M. & Maass, G. (1980)  
Inhibition of *EcoRI* action by polynucleotides. A characterization of the nonspecific binding of the enzyme to DNA  
*Nucleic Acids Res.* **8**: 4727
- Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R. & Jen-Jacobson, L. (1990)  
The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction  
*Science* **250**: 776
- Loeb, T. (1960)  
Isolation of a bacteriophage specific for the F<sup>+</sup> and Hfr mating types of *Escherichia coli* K-12  
*Science* **131**: 932
- Luria, S.E. & Human, M.L. (1953)  
A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses  
*J. Bacteriol.* **64**: 557
- Makinen, M.W., Wells, G.B. & Kang, S.O. (1984)  
Structure and mechanism of carboxypeptidase A  
*Adv. Inorg. Biochem.* **6**: 1
- Maloy, S. & Youderian, P. (1994)  
Challenge phage: dissecting DNA-protein interactions *in vivo*  
In *Methods in Molecular Genetics* (Adolph, K.W., Ed.) **3**: 205, Academic Press, New York
- Marvin, D.A. & Hoffmann-Berling, H. (1963)  
Physical and chemical properties of two new small bacteriophages  
*Nature* **197**: 517

- McClarín, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J. & Rosenberg, J.M. (1986)  
Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3Å resolution  
*Science* **234**: 1526
- McClelland, M., Nelson, M. & Raschke, E. (1994)  
Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases  
*Nucleic Acids Res.* **22**: 3640
- Meisel, A., Mackeldanz, P., Bickle, T.A., Krüger, D.H. & Schroeder, C. (1995)  
Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis  
*EMBO J.* **14** (12): 2958
- Modrich, P. & Zabel, D. (1976)  
*EcoRI* endonuclease physical and catalytic properties of the homogenous enzyme  
*J. Biol. Chem.* **256**: 5866
- Needels, M.C., Fried, S.R., Love, R., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1989)  
Determinants of *EcoRI* endonuclease sequence discrimination  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3579
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1995)  
Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding  
*Science* **269**: 656
- Oelgeschläger, T. (1992)  
Protein-Engineering an der Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Konstruktion von Enzymvarianten mit erweiterter Substratspezifität  
Dissertation, Universität Hannover
- Osuna, J., Flores, H. & Soberón, X. (1991)  
Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities  
*Gene* **106**: 7
- Papworth, C., Bauer, J.C. & Braman, J. (1996)  
Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency  
*Strategies* **9**: 3
- Parker, J. (1988)  
Errors and alternatives in reading of the universal genetic code  
*Microbiol. Rev.* **53**: 273

- Pearson, R.G. (1969)  
Hard and soft acids and bases  
*Survey Prog. Chem.* **5**: 1
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (1997)  
Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases  
*FEBS Lett.* **246**: 1
- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1975)  
Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3310
- Roberts, R.J. & Macelis, D. (1996)  
REBASE-restriction enzymes and methylases  
*Nucleic Acids Res.* **25** (1): 248
- Rosenberg, J.M. & Greene, P. (1982)  
*EcoRI*\* specificity and hydrogen bonding  
*DNA* **1** (2): 117
- Rosenberg, J.M. (1991)  
Structure and function of restriction endonucleases  
*Curr. Op. Struct. Biol.* **1**: 104
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I. & Banzak, L.J. (1975)  
Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases  
in *The Enzymes* (Boyer, P., Ed.): 61
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)  
*Molecular cloning. A laboratory manual* (2. Auflage)  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463
- Scandella, D. & Arber, W. (1974)  
An *Escherichia coli* mutant which inhibits the injection of phage  $\lambda$  DNA  
*Virology* **58**: 504
- Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F. & Pingoud, A. (1992)  
A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *EcoRV*  
*Biochemistry* **31**: 4808

- Sidorova, N.Y. & Rau, D.C. (1996)  
Differences in water release for the binding of *EcoRI* to specific and nonspecific DNA sequences  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12272
- Siksnys, V. & Plekaityte, M. (1993)  
Catalytic and binding properties of restriction endonuclease *Cfr9I*  
*Eur. J. Biochem.* **217**: 411
- Siksnys, V., Zareckaja, N., Vaisvila, R., Timinskas, P., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1994)  
CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R·*MunI* and R·*EcoRI*  
*Gene* **142**: 1
- Siksnys, V., Timinskas, A., Klimasauskas, S., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1995)  
Sequence similarity among type-II restriction endonucleases, related by their recognized 6-bp target and tetranucleotide-overhang cleavage  
*Gene* **157**: 311
- Slilaty, S.N., Fung, M., Shen, S.-H. & Lebel, S. (1996)  
Site-directed mutagenesis by complementary-strand synthesis using a closing oligonucleotide and double-stranded DNA  
*Analyt Biochem.* **185**: 194
- Spangaard, C.W. & van Duin, J. (1988)  
Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7967
- Srivastava, A.K., Montanaro, V. & Kere, J. (1992)  
Simplified template preparation and improved direct sequencing using *Taq* polymerase  
*PCR Meth. Appl.* **1** (4): 255
- Szostak, J.W. (1983)  
The double-strand-break repair model for recombination  
*Cell* **33** (1): 25
- Sturrock, S.S. & Dryden, D.T.F. (1997)  
A prediction of the amino acids involved in DNA recognition by type I DNA restriction and modification enzymes  
*Nucleic Acids Res.* **25** (17): 3408
- Szybalski, W., Kim, S.C., Hasan, N. & Podhajski, A.J. (1991)  
ClassII restriction enzymes - a review  
*Gene* **100**: 13
- Taylor, J.D. & Halford, S.E. (1989)  
Discrimination between DNA sequences by the *EcoRV* restriction endonuclease  
*Biochemistry* **28**: 6198

- Taylor, J.D., Goodall, A.J., Vermote, C.L. & Halford, S.E. (1990)  
Fidelity of DNA recognition by the *EcoRV* restriction/modification system *in vivo*  
*Biochemistry* **30**: 8743
- Terry, B.J., Jack, W.E. & Modrich, P. (1985)  
Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease: nonspecific interactions in *EcoRI* catalysis  
*J. Biol. Chem.* **260**: 13130
- Thielking, V., Alves, J., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1990)  
The accuracy of the *EcoRI* restriction endonuclease: binding and cleavage studies with oligonucleotide substrates containing degenerate recognition sequences  
*Biochemistry* **29**: 4681
- Thielking, V., Selent, U., Köhler, E., Landgraf, A., Wolfes, A., Alves, A. & Pingoud, A. (1992)  
 $Mg^{2+}$  confers DNA binding specificity to the *EcoRV* restriction endonuclease  
*Biochemistry* **31**: 3727
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, F. (1967)  
Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*  
*J. Mol. Biol.* **24**: 339
- Van Cleve, M.D. & Gumpert, R.I. (1992)  
Influence of enzyme-substrate contacts located outside the *EcoRI* recognition site on cleavage of duplex oligodeoxynucleotide substrates by *EcoRI* endonuclease  
*Biochemistry* **31**: 334
- Venclovas, C., Timinskas, A. & Siksnys, V. (1994)  
Five-stranded  $\beta$ -sheet sandwiched with two  $\alpha$ -helices: a structural link between restriction endonucleases *EcoRI* and *EcoRV*  
*Proteins* **20**: 279
- Vipond, I.B. & Halford, S.E. (1995)  
Specific DNA recognition by *EcoRV* restriction endonuclease induced by calcium ions  
*Biochemistry* **34**: 1113
- Vipond, I.B., Baldwin, G.S. & Halford, S.E. (1995)  
Divalent metal ions at the active sites of the *EcoRV* and *EcoRI* restriction endonucleases  
*Biochemistry* **34**: 697
- Walker, G.C. (1984)  
Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*  
*Microbiol. Rev.* **48** (1): 60



- Wang, S., Krinks, M. & Moos, M. Jr. (1995)  
DNA-Sequencing from single phage plaques using solid-phase magnetic capture  
*BioTechniques* **18**: 130
- Wilson, G.G. & Murray, N.E. (1991)  
Restriction and modification systems  
*Annu. Rev. Genet.* **25**: 585
- Windolph, S., Fritz, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H. & Alves, J. (1997)  
Sequence context influencing cleavage activity of the K130E mutant of the restriction endonuclease *EcoRI* identified by a site selection assay  
*Biochemistry* **36** (31): 9478
- Windolph, S. & Alves, J. (1997)  
Influence of divalent cations on inner-arm mutants of restriction endonuclease *EcoRI*  
*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. & Wilson, K.S. (1993)  
The crystal structure of *EcoRV* endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments  
*EMBO J.* **12**: 1781
- Wolfes, H. (1985)  
Zur Struktur und Funktion von Restriktionsendonukleasen: Untersuchungen mit Oligonukleotiden  
Dissertation, Universität Hannover
- Wolfes, H., Alves, J., Fliess, A., Geiger, R. & Pingoud, A. (1986)  
Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 und Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *EcoRI*  
*Nucl. Acid Res.* **14**: 9063
- Woodhead, J.L. & Malcolm, A.D.B. (1980)  
Non-specific binding of restriction endonuclease *EcoRI* to DNA  
*Nucleic Acids Res.* **8**: 389
- Woodhead, J.L., Bhave, N. & Malcolm, A.D.B. (1981)  
Cation dependence of restriction endonuclease *EcoRI* activity  
*Eur. J. Biochem.* **115**: 293
- Worrall, A.F. & Connolly, B.A. (1990)  
The chemical synthesis of a gene coding for bovine pancreatic DNAse I and its cloning and expression in *Escherichia coli*  
*J. Biol. Chem.* **265** (35): 21889

- Wright, D.J., King, K. & Modrich, P. (1989)  
The negative charge of Glu-111 is required to activate the cleavage center of *EcoRI* endonuclease  
*J. Biol. Chem.* **264**: 11816
- Xu, S.-Y. & Schildkraut, I. (1991)  
Isolation of *BamHI* variants with reduced cleavage activities  
*J Biol. Chem.* **266**: 4425
- Yang, W., Hendrickson, W.A., Crouch, R.J. & Satow, Y. (1990)  
Structure of ribonuclease H phased at 2Å resolution by MAD analysis of the selenomethionyl protein  
*Science* **249**: 1398
- Yanofsky, S.D., Love, R., McClarin, J.A., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1987)  
Clustering of null mutations in the *EcoRI* endonuclease  
*Proteins* **2**: 273
- Zebala, J., Choi, J. & Barany, F. (1992)  
Characterization of steady state, single turnover, and binding kinetics of the *TaqI* restriction endonuclease  
*J. Biol. Chem.* **267**: 8097
- Zinder, N.D., Valentine, R.C., Roger, M. & Stoeckenius, W. (1963)  
f1, a rodshaped male-specific bacteriophage that contains DNA  
*Virology* **20**: 638





## Lebenslauf

Name: Gabriele Grabowski

Anschrift: Dorfstraße 99  
31275 Lehrte OT Steinwedel

Geburtsdatum: 02.04.1962 in Steinwedel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Werdegang:

August 1968 - August 1972	Grundschule in Steinwedel
September 1972 - Juli 1978	Realschule in Lehrte (erweiterter Sekundarabschluß I)
September 1978 - Juli 1979	Berufsbildende Schulen in Lehrte
Oktober 1979 - September 1981	Lehranstalt zur Ausbildung von vet.-med.-techn. Assistenten an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
September 1981 - Juni 1984	Gymnasium in Burgdorf (Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife)
Juli 1984 - Oktober 1985	Wartesemester, während dieser Zeit arbeitssuchend gemeldet beim Arbeitsamt Lehrte
November 1985 - Oktober 1986	Fortbildungskurs: "Moderne chemische und biochemische Arbeits- und Analysemethoden"
Oktober 1986 - April 1993	Studium der Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hannover mit Fachwechsel zum Studiengang Biochemie im dritten Fachsemester
Mai 1993 - November 1993	Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Thema "Charakterisierung des aktiven Zentrums der Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i> mithilfe zielgerichtet hergestellter Mutanten" Abschluß als Dipl.-Biochem.

- Dezember 1993 - Januar 1994      Betreuung des Praktikums Physiologische Chemie (Teil Nukleinsäuren) des Studienganges Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
- seit Februar 1994      Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
- zusätzliche Kenntnisse:
- Bescheinigte Teilnahme an der Fortbildungsveranstaltung "Gentechnische Sicherheit" nach §15 Abs.2 Satz1 Nr.3 GenTSV
- Bescheinigte Teilnahme an der Lehrveranstaltung "Tierexperimentelle Methoden I" nach §9 Abs.1 TSG
- Bescheinigte Teilnahme an einer Lehrveranstaltung zur Erlangung der Fachkunde zum Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen gemäß §6 StrschV

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.

Steinwedel, den 21. Januar 1998

Gabriele Grabowski

