

**Untersuchung und Design von DNA-
Kontakten der Restriktionsendonuklease
EcoRI inner- und außerhalb der
Erkennungssequenz**

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

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biochem. Olaf Rosati
Geboren am 22.08.1966

Hannover 1999

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie (Leiter: Prof. Dr. Manfred Lindau) an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.01.1997 bis zum 03.11.1999 unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Alves angefertigt.

Tag der Promotion: 14.12.1999

Referent: Prof. Dr. J Alves

Korreferent: Priv. Doz. Dr. W. Müller

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht oder wurden auf Tagungen vorgestellt.

Veröffentlichungen

Küster, W., Rosati, O. and Alves, J. (1999).

Amino acid residues at position 197 of the *EcoRI* restriction endonuclease do not contribute to DNA recognition.

Manuskript eingereicht

Poster und Tagungsbeiträge

Alves, J., Grabowski, G., Küster, W., Rosati, O. and Vennekohl, P. (1998).

Protein design within the *EcoRI* restriction endonuclease. *Biol. Chem.* **379**, S45.

Posterabstract zur Herbsttagung der GBM, Jena

Rosati, O and Alves, J. (1999).

Towards the Design of an 8 base pair cutter based on the restriction endonuclease *EcoRI*. *Prot. Science* **8**,S54; Posterabstract zum 3^d European Symposium of the Protein Society, Garmisch-Patenkirchen

Danksagungen

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

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

Herrn Dr. H. Wolfes danke ich für seine große Bereitschaft zu Helfen und auch für die Synthese zahlreicher Oligonukleotide.

Frau Dr. G. Grabowski danke ich für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft (nicht nur mit dem „kk-Gen“!) die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn R. Mull-Grotefend ("Rolo") danke ich für die große Hilfe an der Laborfront, im Kampf mit den Mutanten, die wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau P. Vennekohl danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit während der dreijährigen gemeinsamen Doktorandenzeit. „Bald hast Du's geschafft!“

Frau U. Kayßer ("Rosi") danke ich für allen Spaß den man im Labor haben kann, wenn auch mal die Fetzen fliegen.

Allen anderen Mitgliedern der Abteilungen Biophysikalische Chemie und Biochemisch-Biophysikalische Verfahren danke ich das gute Arbeitsklima und für alle Unterstützung die ich bekommen habe.

Herrn Dr. S. B. Katti danke ich für die Synthese der Methylphosphonate.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meinem himmlischen Vater für jede Unterstützung und Ermutigung die ich bekommen habe.

Abkürzungsverzeichnis

A	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
Å	10^{-10} m
AAP	Agaroseauftragspuffer
Ado Met	S-Adenosylmethionin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bdestilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
C	2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat
ca.	circa
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propan sulfonat
Ci	Curie
cfu	<i>colony forming units</i>
d	Desoxy-
D	Dalton
dd	Didesoxy-
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	äquimolare Mischung der 2'Desoxyribonukleosid-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythriol
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ϵ_x	Extinktionskoeffizient bei x nm
G	2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
His	Histidin
His ₆	His-Hexapeptid
K_{kat}	katalytische Geschwindigkeitskonstante
K_{ass}	Assoziationskonstante
l	Liter
LAP	Laemmli-Auftragspuffer
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampère
MESH	-Mercaptoethanol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
n	nano-(10^{-9})
Ni-NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriacetat

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

Aminosäuren werden unter Verwendung des international üblichen Ein-Buchstaben bzw. Drei-Buchstaben Codes abgekürzt. Eine Zahl hinter der mit drei Buchstaben abgekürzten Aminosäure kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins.

Mutanten werden nach folgendem Schema benannt: Alte Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code), Positionsnummer, neue Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Restriktionsendonukleasen	1
1.2 Die Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	3
1.3 Struktur von <i>EcoRI</i>	5
1.4 Strukturvergleich mit anderen TypII-Restriktionsendonukleasen	6
1.5 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion	10
1.6 Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz	11
1.7 Katalysemechanismus	14
1.8 Ziel der Arbeit	17
1.8.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für die Spezifität und katalytische Aktivität von <i>EcoRI</i>	17
1.8.1.1 Nachweis einer Me^{2+} -Bindungstasche in unmittelbarer Umgebung der <i>inner arm</i> Region der Mutante K130E	17
1.8.1.2 Nachweis eines Phosphatkontaktes an der Position K117	18
1.8.1.3 Untersuchungen von Phosphatkontakten des <i>EcoRI</i> -wt und der K117-Mutanten mit modifizierten Oligonukleotiden	18
1.8.2 Erweiterung der Spezifität von <i>EcoRI</i>	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Mikrobiologische Methoden	19
2.1.1 Bakterienstämme	19
2.1.2 Verwendete Vektoren	20
2.1.3 Kompetente Zellen	21
2.1.4 Transformation	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1 Mutagenesestrategien	23
2.2.1.1 <i>Gapped-duplex</i> -Mutagenese	23
2.2.1.2 PCR-Mutagenese	25
2.2.2 Mutageneseprimer	28
2.2.3 Sequenzierung (modifizierte Arbeitsvorschrift von Pharmacia)	31
2.2.3.1 Annealingreaktion	31
2.2.3.2 Markierungsreaktion	32
2.2.3.3 Terminationsreaktion	32
2.2.3.4 Sequenziergel	33

2.3 Proteinchemische Arbeiten	33
2.3.1 Expressionstest	33
2.3.2 Fermentation	34
2.3.3 Zellaufschluß	34
2.3.4 Chromatographische Verfahren	35
2.3.4.1 Affinitätschromatographie	35
2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie	36
2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2.3.6 Dialyse	38
2.3.7 UV-Spektroskopie	39
2.4 Biochemische Charakterisierung der <i>EcoRI</i>-Mutanten	39
2.4.1 λ -DNA-Kinetiken	39
2.4.2 pUC8-Kinetiken	40
2.4.3 Kinetiken mit modifizierten Oligonukleotiden	40
2.4.3.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	42
2.4.4 Gelretardationsexperimente (<i>Mobility-shift-Assays</i>)	42
2.4.4.1 Bindungsansätze	43
2.4.4.2 Ca^{2+} - <i>Mobility-shift-Assay</i>	44
2.4.4.3 <i>Mobility-shift-Assay</i> mit modifizierten Oligonukleotiden	45
2.4.4.4 CD-Spektroskopie	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für die Spezifität und katalytische Aktivität von <i>EcoRI</i>	46
3.1.1 Nachweis einer postulierten Metallionen-Bindungstasche in unmittelbarer Umgebung der <i>Inner arm</i> Region der Mutante K130E	46
3.1.1.1 Zielgerichtete Mutagenese	48
3.1.1.2 CD-Daten der <i>Inner arm</i> -Mutanten	49
3.1.1.3 Spaltverhalten der <i>EcoRI</i> -Mutanten der <i>Inner arm</i> -Region	49
3.1.1.4 Bindungsverhalten der <i>EcoRI</i> -Mutanten der <i>Inner arm</i> -Region	51
3.1.2 Nachweis eines Phosphatkontaktes an der Position K117	53
3.1.2.1 Gezielte Mutagenese und Proteinexpression der K117-Mutanten	54
3.1.2.2 CD-Daten der K117-Mutanten	55
3.1.2.3 Spaltverhalten der K117-Mutanten	56
3.1.2.4 Bindungsverhalten der K117-Mutanten	57
3.1.2.5 Einfluß einwertiger Kationen auf das Spaltverhalten von wt- <i>EcoRI</i> und K117E	59
3.1.2.6 pH-Wert-Abhängigkeit der Spaltaktivität der Mutanten K117D, K117E und K117Q	60

3.1.3 Untersuchungen von Phosphatkontakten des <i>EcoRI</i> -wt und der K117-Mutanten mit modifizierten Oligonukleotiden.....	61
3.1.3.1 Spalt- und Bindungsverhalten von wt <i>EcoRI</i> mit Methylphosphonat- Substraten.....	63
3.1.3.2 Spaltverhalten und Bindungsverhalten der Mutanten K117A, K117E und K117L mit den Methylphosphonaten.....	64
3.2. Erweiterung der Spezifität von <i>EcoRI</i>	66
3.2.1 Mutationen an der Position I197.....	67
3.2.1.1 CD-Daten der I197-Mutanten.....	68
3.2.1.2 Spalt und Bindungsverhalten der I197-Mutanten.....	68
3.2.2 Zusätzliche Schwächung der Substraterkennung an der Position Ala142.....	70
3.2.2.1 CD-Daten.....	71
3.2.2.2 Spalt und Bindungsverhalten.....	71
3.2.3 Ausrichtung der Position I197Q in die große Grube.....	72
3.2.3.1 CD-Daten.....	74
3.2.3.2 Spalt- und Bindungsdaten.....	74
3.2.4 Kombination von Ausrichtung der Position I197Q mit der Schwächung der Substraterkennung.....	76
3.2.4.1 CD-Daten.....	76
3.2.4.2 Spalt und Bindungsverhalten.....	76
3.2.5. Vergrößerung der Reichweite der Position I197Q in die große Grube.....	77
3.2.5.1 CD-Daten.....	78
3.2.5.2 Spalt- und Bindungsverhalten.....	79
3.2.6 Kombination von Ausrichtung oder Schwächung der Erkennung mit einer I197Q mit vergrößerter Reichweite.....	80
3.2.6.1 CD-Daten.....	80
3.2.6.2 Spalt und Bindungsverhalten.....	80
4 Diskussion	83
4.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für die Spezifität und katalytische Aktivität von <i>EcoRI</i>	83
4.1.1 Nachweis einer potentiellen Metallionen-Bindungsstelle in unmittelbarer Umgebung der <i>inner arm</i> -Region der Mutante K130E.....	83
4.1.2 Untersuchung eines Phosphatkontaktes an der Position Lys117.....	88
4.1.3 Spalt- und Bindungsverhalten von wt <i>EcoRI</i> mit Methylphosphonat-Substraten.....	95
4.1.4 Spalt- und Bindungsverhalten der K117-Mutanten mit Methylphosphonat-Substraten.....	101

4.2. Erweiterung der Spezifität von <i>EcoRI</i>	103
5 Zusammenfassung	111
5.1 Abstract	113
6 Literaturverzeichnis	113
7 Anhang	123

1 Einleitung

1.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in Prokaryonten weitverbreitete Endonukleasen, die kurze spezifische DNA-Sequenzen erkennen und in beiden Strängen spalten [Luria & Human, 1952]. Sie kommen als Restriktions/Modifikationssystem (R/M-System) vergesellschaftet mit ihrer korrespondierenden Methyltransferase vor und dienen den Bakterien zur Abwehr gegen eindringende Fremd-DNA, die z.B. über Bakteriophageninfektion in die Zelle gelangt ist. Die zelleigene DNA der Bakterienzelle wird durch spezifische Methylierung im Bereich der Erkennungssequenz von der Methyltransferase vor der Spaltung durch das Restriktionsenzym geschützt. Man unterscheidet zwei Klassen von Methyltransferasen [Cheng, 1995a; Cheng, 1995b], welche die DNA in Gegenwart von S-Adenosyl-Methionin (AdoMet) entweder an einem exocyclischen Stickstoffatom (N4-Methylcytosin oder N6-Methyladenin) oder an einem Ringkohlenstoffatom (C5-Methylcytosin) methylieren. Anders als bei den Restriktionsendonukleasen, besitzen alle bisher sequenzierten Methylasegene ausgeprägte Sequenzhomologien, die vor allem in den Kofaktorbindenden Bereichen auftreten [Klimasauskas *et al.*, 1994].

R/M-Systeme werden in vier verschiedene Klassen eingeteilt, die sich über die Quartärstruktur-Zusammensetzung in Untereinheiten, den Kofaktorbedarf, sowie die Art der Erkennungssequenz und die Position der Spaltung charakterisieren lassen [Heitman, 1993; Pingoud & Jeltsch, 1997]. Allen Systemen gemeinsam ist der Bedarf an divalenten Kationen (Mg^{2+}), um katalytisch aktiv zu sein. Mittlerweile sind etwa 3200 Restriktionendonukleasen bekannt [Roberts & Macelis, 1999], wovon 19 TypI, 223 TypII und 4 TypIII-Spezifitäten charakterisiert sind.

R/M-Systeme vom TypI bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten (R; M; S-Untereinheit) und vereinen Restriktions- und Modifikationsaktivität in einem Enzymkomplex. Die R-Untereinheit bewirkt die DNA-Spaltung, die M-Untereinheit bewirkt die Methylierung der zelleigenen DNA und die S-Untereinheit die spezifische Erkennung. Als Kofaktoren werden ATP, S-Adenosyl-Methionin und Mg^{2+} benötigt. Die Erkennungssequenz ist unterbrochen mit drei und vier spezifitätsbestimmenden Basenpaaren in einem definiertem Abstand voneinander. Die DNA-Spaltung erfolgt in großer Entfernung zur Erkennungssequenz. Aus Sequenzvergleichen und

Strukturvorhersagen wurde für alle 51 bisher bekannten Erkennungsdomänen (*Target recognition domains*) eine identische Tertiärstruktur ermittelt [Sturrock *et al.*, 1997].

In TypII-Systemen liegen Restriktionsendonuklease und Methylase als getrennte Enzyme vor. Die Methylasen arbeiten als Monomere und benötigen Adomet als Kofaktor. Die aktive Restriktionsendonuklease liegt als Homodimer vor, welches die DNA in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen spaltet. Die Spaltung erfolgt innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der 4-8Bp langen palindromen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung werden entweder glatte (*Blunt ends*) oder überhängende DNA-Enden (3' oder 5'-überhängend; *Sticky ends*) erzeugt.

Für die Beschreibung von TypII-Systemen mit ungewöhnlichen Eigenschaften wurden zwei Unterklassen eingeführt. Restriktionsendonukleasen des TypIIe werden durch die Bindung einer zweiten Erkennungssequenz, die als Effektor wirkt, allosterisch aktiviert [Krüger *et al.*, 1995] und spalten innerhalb der palindromen Erkennungssequenz. TypIIs-Restriktionsendonukleasen erkennen 4-7Bp lange Erkennungssequenzen und spalten in definiertem Abstand außerhalb dieser Sequenz.

TypIII-R/M-Systeme bestehen aus Untereinheit R für die Restriktion und Untereinheit M für die Modifikation. Im Gegensatz zur Modifikation, bei der die Methyltransferase allein in Gegenwart von AdoMet katalytisch aktiv ist, wird für die Restriktion das Zusammenwirken beider Untereinheiten in Gegenwart von ATP benötigt. Das ATP wird dabei nicht hydrolysiert. Die Erkennungssequenzen von TypIII-Restriktionsendonukleasen sind asymmetrisch und die Spaltung erfolgt in definiertem Abstand von etwa 25Bp [Bickle, 1993].

In der letzten Klasse, den TypIV-R/M-Systemen, werden Restriktionsendonukleasen zusammengefaßt, deren DNA-Spaltung durch AdoMet stimuliert wird, jedoch ATP-unabhängig ist. Die Erkennungssequenzen der TypIV-Restriktionsendonukleasen sind asymmetrisch und haben eine Länge von 6Bp. Die DNA-Spaltung erfolgt in einem definiertem Abstand außerhalb der Erkennungssequenz [Janulaitis *et al.*, 1992a; Janulaitis *et al.*, 1992b].

Ein ungewöhnliches Spaltverhalten innerhalb der Restriktionsendonukleasen zeigen Enzyme vom *Bcgl*-Typ. Diese Restriktionsendonukleasen erkennen eine unterbrochene Basensequenz und spalten die DNA in definiertem Abstand auf beiden Seiten außerhalb dieser Sequenz.

1.2 Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Restriktionsendonukleasen haben aufgrund ihrer Eigenschaften eine zentrale Bedeutung im Bereich der Molekularbiologie erlangt. Weiterhin stellen sie Modellsysteme zur Betrachtung von Protein-DNA-Wechselwirkungen dar und bieten die Möglichkeit, allgemeine Gesetzmäßigkeiten der DNA-Erkennung und der anschließenden Katalyse abzuleiten.

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) besteht aus 276 Aminosäuren (31kDa) bekannter Sequenz [Greene *et al.*, 1981; Newman *et al.*, 1981]. Das Enzym ist als Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten aktiv [Alves *et al.*, 1982]. Weiterhin ist auch die Bildung von Tetrameren [Modrich & Zabel, 1976] sowie höheren Polymeren [Luke & Halford, 1985] mit ausgeprägt schlechter Löslichkeit und Aggregationsneigung [Fritz, 1991; Oelgeschläger, 1992; Engel, 1993; Grabowski, 1993] in höheren Konzentrationen möglich.

EcoRI ist in der Lage, DNA unspezifisch zu binden und in einem linearen Diffusionsprozeß auf die palindrome Erkennungssequenz GAATTC zu untersuchen. Die Erkennungssequenz wird hochspezifisch erkannt [Terry *et al.*, 1985; Jeltsch *et al.*, 1994a] und in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen in beiden Strängen zwischen dem Guanin und Adenin gespalten (Abb. 1). Die gleiche Sequenz wird auch von der *EcoRI*-Methylase erkannt [Hedgpeth *et al.*, 1972] und am exozyklischen N6-Atom des inneren Adenins methyliert.

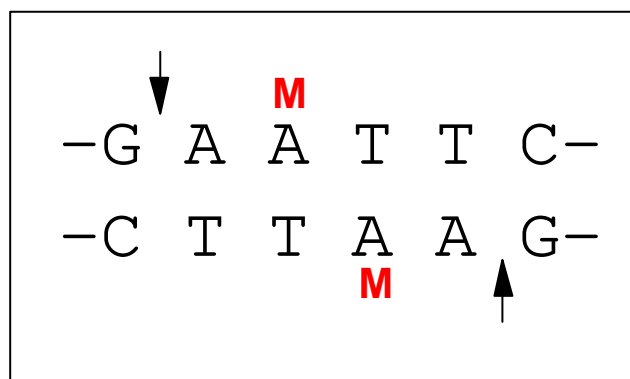


Abb. 1: *EcoRI*-Erkennungssequenz (→ Spaltpositionen; M die methylierten Adenine).

Unter sogenannten Starbedingungen werden auch Sequenzen gespalten, die sich in einem Basenpaar von der kanonischen Erkennungssequenz unterscheiden. Die Relaxierung der Spezifität wird durch hohe Konzentrationen an Glycerin oder

anderen organischen Lösungsmitteln [Goodman *et al.*, 1977], erhöhtem pH-Wert bei niedriger Ionenstärke [Polisky *et al.*, 1975] oder Austausch von Mg^{2+} durch Mn^{2+} [Hsu & Berg, 1978] erreicht. Weiterhin führen auch sehr hohe Enzymkonzentrationen zur Spaltung von Starsequenzen [Pingoud, 1985].

Die erste Röntgenstruktur der Restriktionsendonuklease *EcoRI* im Komplex mit dem Oligonukleotid $d(TCGCGAATTCGCG)_2$ wurde 1986 veröffentlicht [McClarín *et al.*, 1986]. Aus der Analyse von weiteren *EcoRI*-Schwermetall-Derivaten wurde 1990 eine korrigierte Struktur veröffentlicht [Kim *et al.*, 1990]. Die beiden *EcoRI*-Untereinheiten bilden als Dimer eine annähernd globuläre Struktur mit einem Durchmesser von 5nm aus, die die DNA umschließt. Dazu umgreift jede Untereinheit die DNA mit armähnlichen Strukturen, die als *Inner arm* und *Outer arm* bezeichnet werden (Abb. 2).

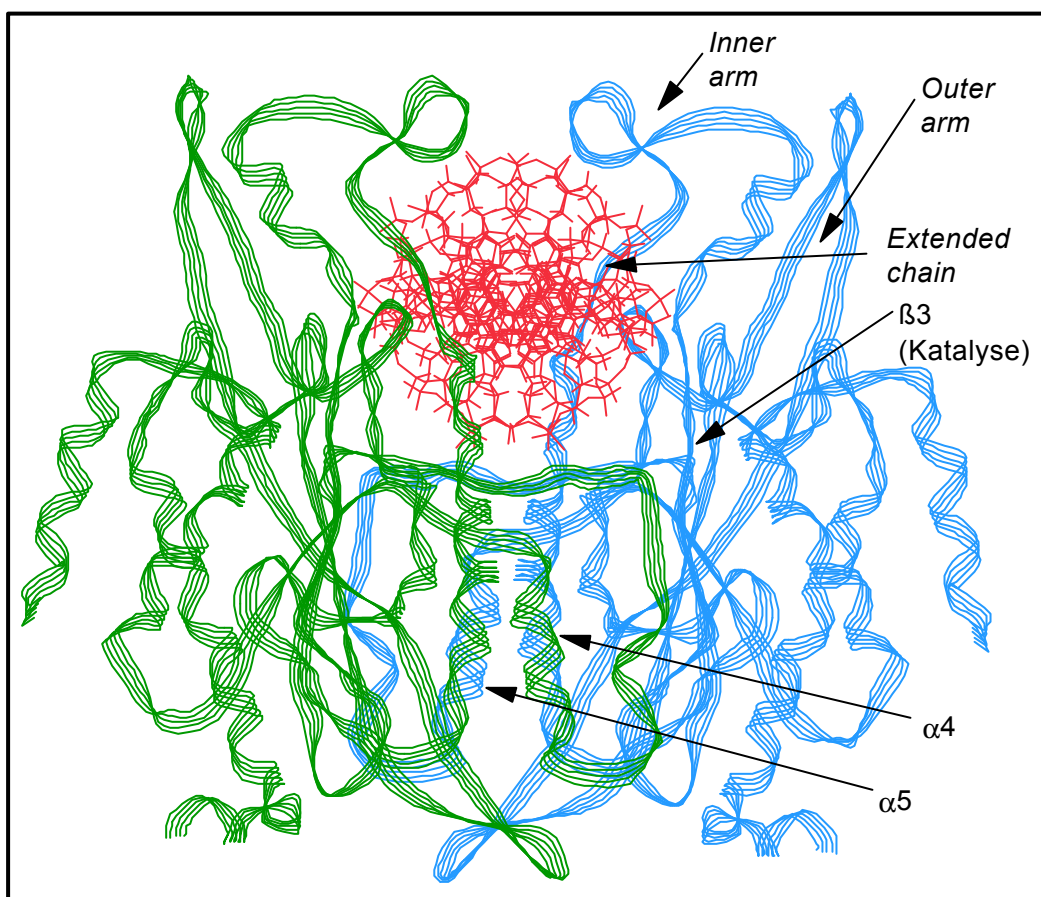


Abb. 2: Strukturmodell des *EcoRI*-DNA-Komplexes.

Die DNA erfährt durch die Bindung des Enzyms eine ausgeprägte Konformationsänderung. In freier Lösung weist die Erkennungssequenz hauptsächlich eine B-DNA ähnliche Konformation auf [Lane *et al.*, 1991]. Die Bindung des

Enzyms entwindet die große Grube der DNA um 28° [Rosenberg, 1991] und induziert einen Knick von etwa 30° [McClarin, 1986]. Dadurch wird die große Grube um ca. 0,35nm aufgeweitet und die Einlagerung von je zwei α -Helices und einem ausgestreckten Abschnitt der Polypeptidkette pro Untereinheit des Enzyms (Vier-Helix-Bündel und *Extended chain*-Motiv) in die große Grube für die Erkennung der Basensequenz ermöglicht. Die kleine Grube der DNA bleibt dabei dem Lösungsmittel zugewandt.

1.3 Struktur von *EcoRI*

Das zentrale Strukturmotiv einer *EcoRI*-Untereinheit wird von einem fünfsträngigen β -Faltblatt und vier α -Helices gebildet (Abb. 3). Das katalytische Zentrum liegt innerhalb eines sogenannten β -Mäanders, der sich aus den antiparallelen Strängen $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ zusammensetzt. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren sind Asp91, Glu111 und Lys113.

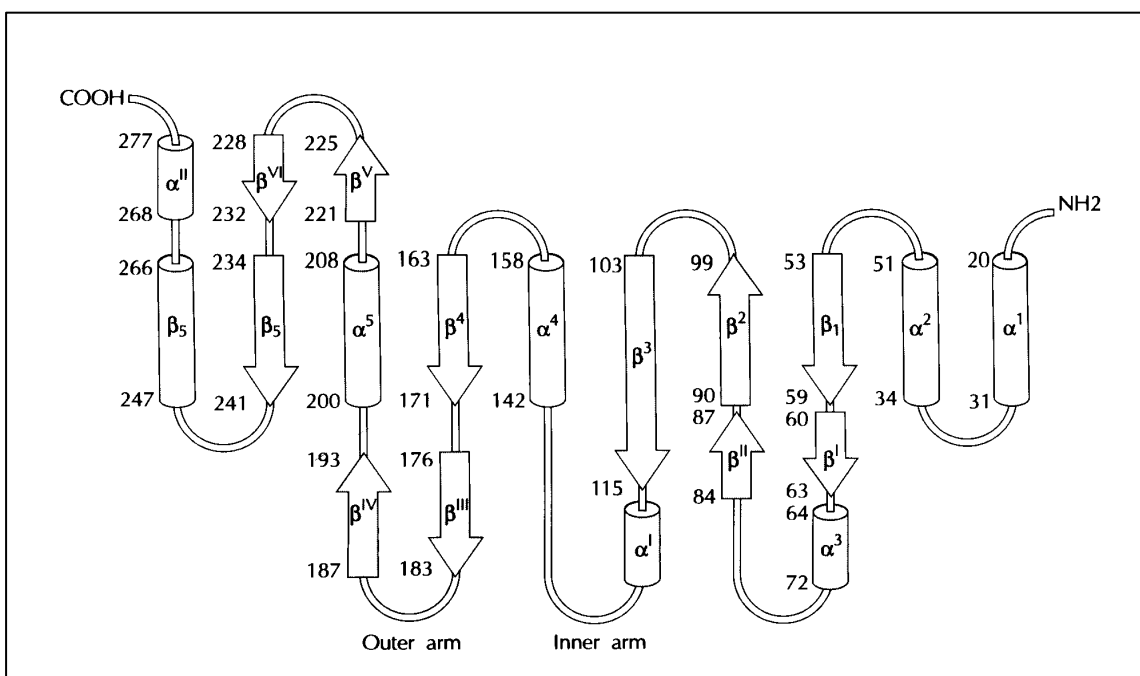


Abb. 3: Schematische Darstellung der Strukturanteile von *EcoRI* gemäß Rosenberg (1991).

Die Stränge $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 5$ verlaufen parallel und bilden die Basis eines nukleotidbindenden Faltblatt-*Turn*-Helix-Motivs, das der Rossmann-Falte [Rossmann *et al.*, 1975], einem Nukleotid-Bindungsmotiv in vielen Dehydrogenasen, ähnelt. Die

Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ werden als innere und äußere Erkennungshelices bezeichnet. Zusammen mit den entsprechenden Helices der zweiten Untereinheit bilden sie ein Vier-Helix-Bündel, das weit in die große Grube eindringt. Am N-terminalen Ende der Helix $\alpha 4$ befindet sich das aus den Aminosäuren 137-142 bestehende sogenannte *Extended chain*-Motiv. Das Motiv stellt das Haupterkennungsmotiv der *EcoRI* dar und ist im Komplex mit der DNA nahezu parallel in die große Grube eingelagert, wo es spezifische Wechselwirkungen zu den Purin- und Pyrimidinbasen der Erkennungssequenz ausbildet (Abb. 7). Direkt davor liegt die *inner arm*-Region (Aminosäuren 124-136), die gemeinsam mit der von einem antiparallelen Faltblatt gebildeten *Outer arm*-Region (Aminosäuren 176-193) die DNA-Doppelhelix umgreift. Beide Strukturelemente bilden eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken und van der Waals-Wechselwirkungen im Bereich der Erkennungssequenz und zu den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates. Ein weiteres Strukturmotiv, bestehend aus den antiparallelen Faltblättern βI und βII sowie der Helix $\alpha 3$ und dem sie verbindenden *Loop*, ist die sogenannte β -*Bridge*. Sie stellt im aktiven Homodimer über die Aminosäure Ile73 und Asn85 Verbindung zur zweiten Untereinheit her.

1.4 Strukturvergleich mit anderen TypII-Restriktionsendonukleasen

Ein Sequenzvergleich der ca. 50 bisher sequenzierten und biochemisch charakterisierten TypII-Restriktionsenzyme zeigt nur geringe Homologien in den Gesamtsequenzen, mit Ausnahme von einigen Iso- und Neoschizomeren. Nur für bestimmte Bereiche, die homologe funktionelle und strukturelle Eigenschaften aufweisen, konnten signifikante Übereinstimmungen gefunden werden [Siksnys *et al.*, 1994]. Es sind bisher sechs TypII-Restriktionsendonukleasen als DNA-Enzym-Komplex kristallisiert. Dabei handelt es sich um *Bam*HI [Newman *et al.*, 1994], *Bgl*II [Newman *et al.*, 1998], *Eco*RI [Rosenberg, 1991], *Eco*RV [Winkler *et al.*, 1993], *Fok*I [Wah *et al.*, 1997] und *Pvu*II [Athanasiadis *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995]. Für das Restriktionsenzym *Cfr*10I ist nur eine Kristallstruktur ohne DNA vorhanden [Bozic *et al.*, 1996], weshalb es sich nur bedingt für Vergleiche mit den anderen Restriktionsenzymen eignet. Die Enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Fok*I, *Bgl*II und *Cfr*10I erzeugen 5'-überhängende DNA-Enden (*Sticky ends*), während *Eco*RV und *Pvu*II glatte Enden (*Blunt ends*) erzeugen. Trotz der mangelnden Sequenzhomologien weisen die

Enzyme weitreichende Strukturhomologien auf, die um so ausgeprägter sind zwischen den Enzymen *EcoRI*, *BamHI* und *BglI*, sowie *EcoRV* und *PvuII* mit jeweils identischen Spaltproduktenden (Abb. 4). FokI schneidet als TypII_S-Enzym die DNA neben der Erkennungssequenz GGATGN₉/N₁₄ eine Helixwindung entfernt.

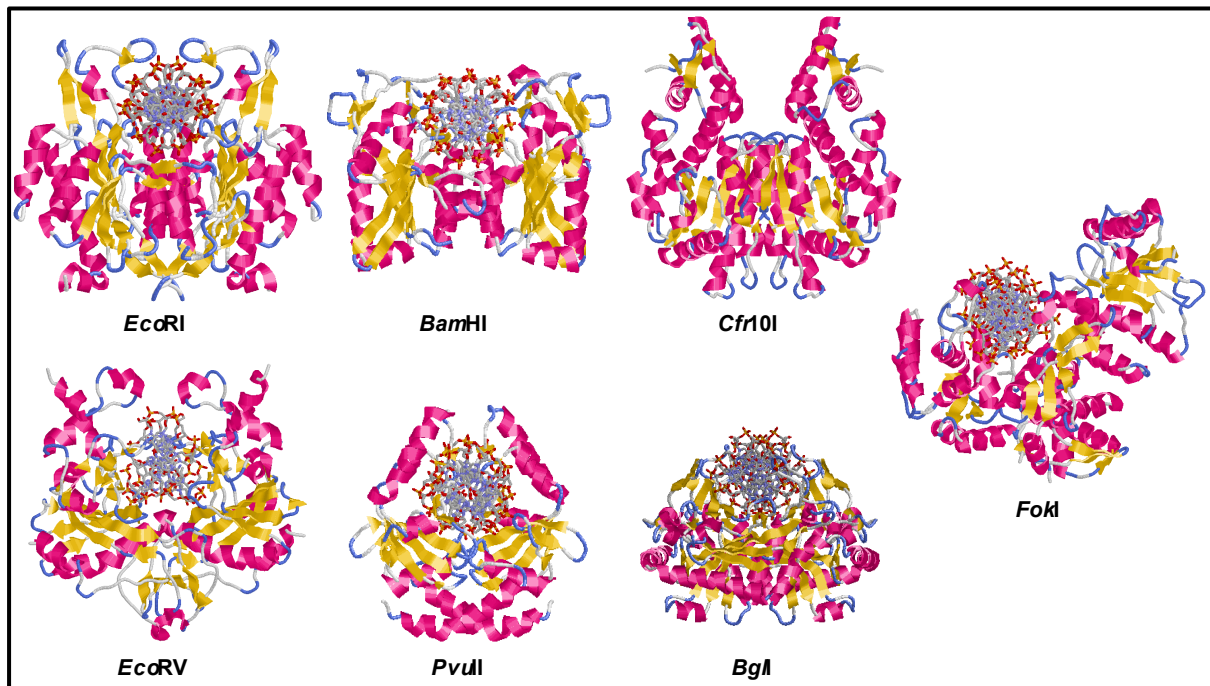
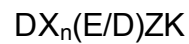


Abb. 4: Vergleich der Strukturen von Restriktionsendonukleasen im Komplex mit DNA.

Im Gegensatz zu den *Sticky end*-Schneidern, die sich der DNA hauptsächlich von der großen Grube nähern, liegt bei den *Blunt end*-Schneidern die Hauptmasse des Enzyms im Bereich der kleinen Grube, was an den unterschiedlichen relativen Positionen der zu spaltenden Phosphodiesterbindungen liegt.

Alle sieben Enzyme zeigen Homologien in einem zentralen Strukturmotiv, daß aus einem fünfsträngigem β -Faltblatt besteht und die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren enthält. Die Superpositionen der katalytisch bedeutsamen Aminosäurereste gegenüber der zu spaltenden Phosphodiesterbindung sind identisch angeordnet (Abb. 5). Die Ausnahmen bilden *BamHI*, wo die basische Aminosäure Lysin durch ein Glutamat ersetzt ist, sowie *Cfr10I*, wo sich anstelle der zweiten sauren Aminosäure ein Serin befindet und für die Katalyse ein Glutamatrest aus einer nahegelegenen α -Helix verwendet wird. Aus den Daten für das zentrale Strukturmotiv wurde für das katalytische Zentrum von Restriktionsendonukleasen ein allgemeines Strukturmotiv abgeleitet [Selent *et al.*, 1992].



n=9-19

X=beliebige Aminosäure

Z=hydrophobe Aminosäure

Auch für weitere Nukleasen, wie die λ -Exonuklease [Kovall & Matthews, 1998] und das Reparaturenzym MutH [Ban & Yang, 1998] ist eine ähnliche Organisation des aktiven Zentrums gefunden worden.

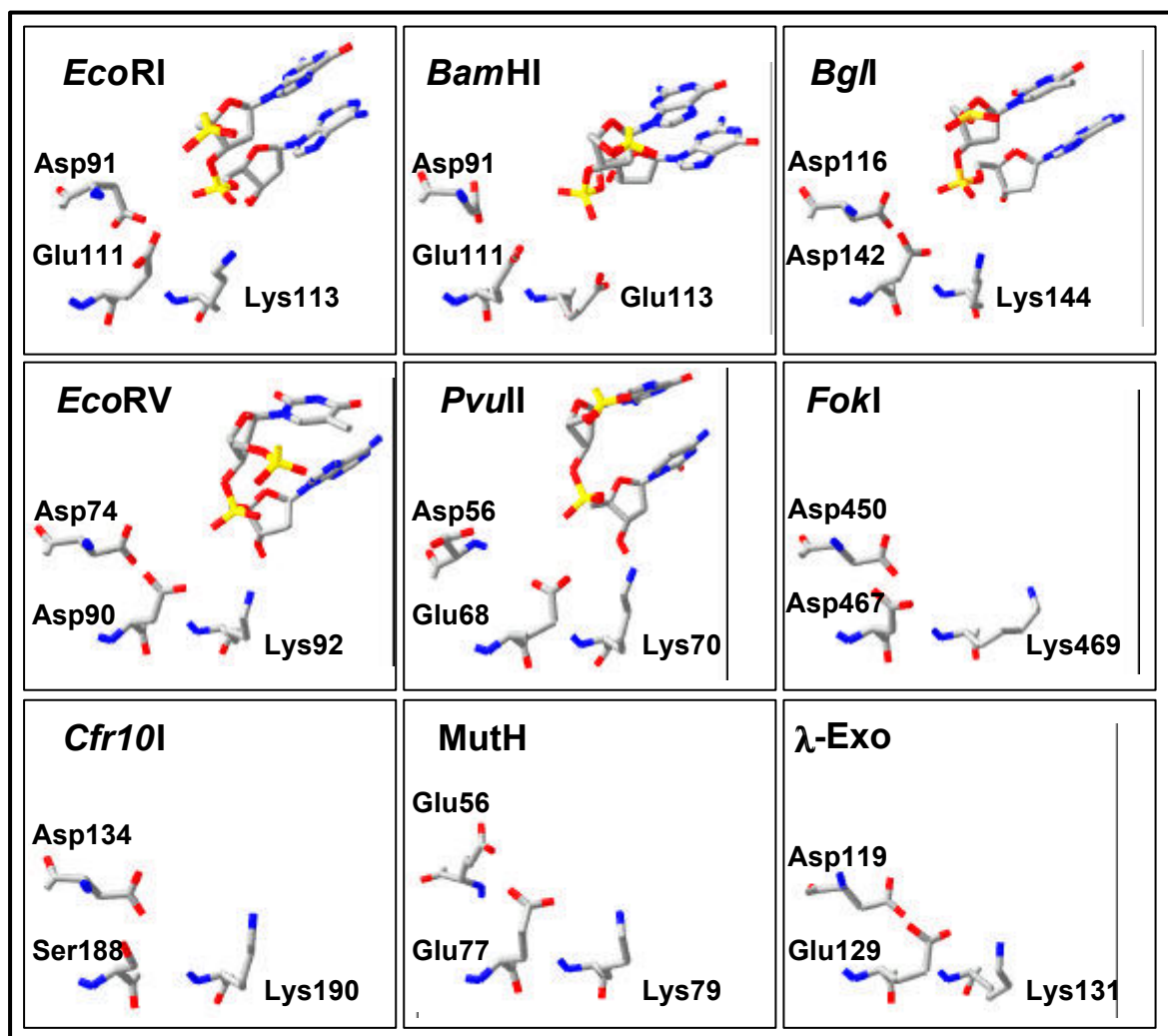


Abb. 6: Strukturen der katalytischen Zentren von *BamHI*, *BglI*, *CfrI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *FokI* und *PvuII*, sowie λ -Exo, MutH.

Die anderen Strukturanteile weisen deutliche Unterschiede auf. Nachfolgend werden die beiden *Sticky end*-Schneider *EcoRI* und *BamHI*, sowie die *Blunt end*-Schneider *EcoRV* und *PvuII* näher miteinander verglichen. Die spezifische DNA-Erkennung erfolgt bei *EcoRI* über das bereits erwähnte *Extended chain*-Motiv (Met 137-Arg145),

bei *Bam*HI über α -Helices und den C-terminalen Arm, bei *Eco*RV über die sogenannten *Inner* und *Outer-Loops* und bei *Pvu*II über β -Faltblätter [Pingoud, A. and Jeltsch, A. 1997]. Im Vergleich der beiden *Sticky end*-Schneider *Bam*HI und *Eco*RI sind große Strukturhomologien zu erkennen (Abb. 6), so daß ein gemeinsamer Ursprung vermutet wird [Newman *et al.*, 1994]. Dies wird unterstützt durch die Verwendung eines Vier-Helix-Bündels von beiden Enzymen für die DNA-Erkennung und Dimerisierung.

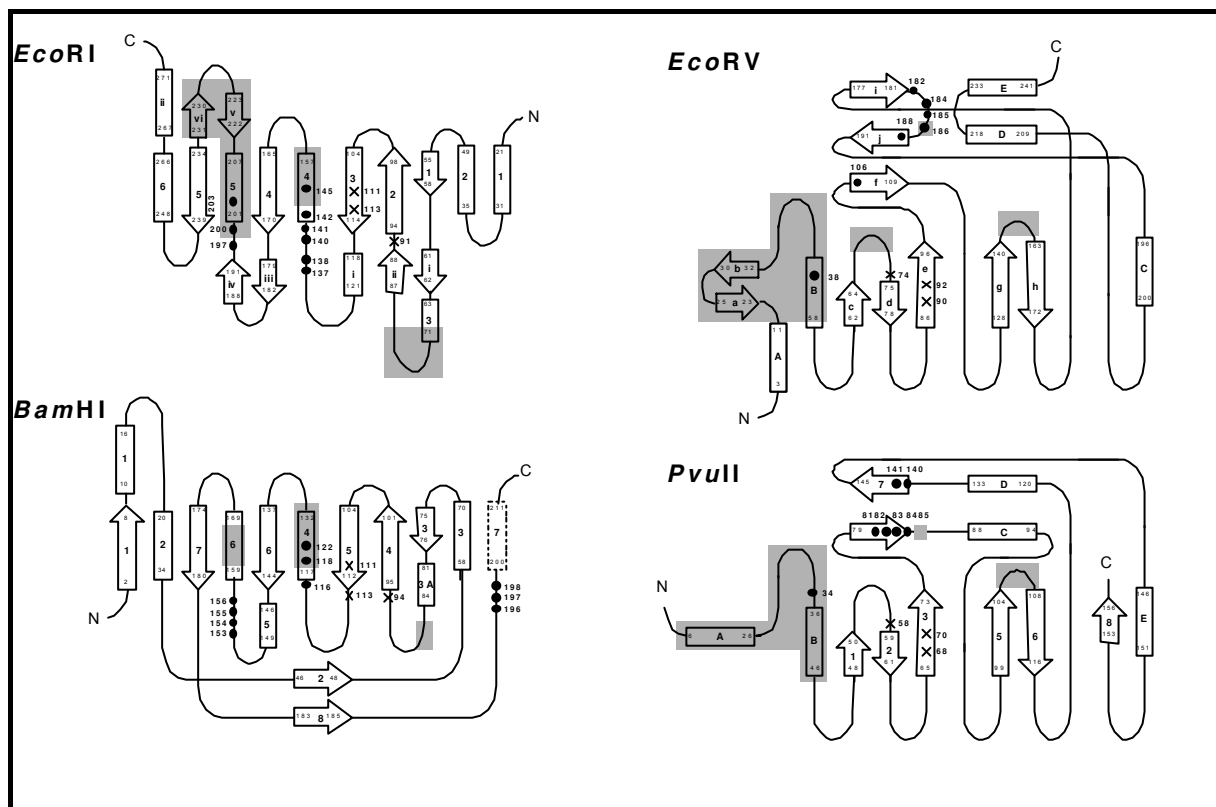


Abb.6: Strukturanteile der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV und *Pvu*II im Vergleich. An der Katalyse beteiligte Aminosäuren sind durch ein Kreuz (X), an der DNA-Bindung beteiligte Aminosäuren durch einen Punkt (•) und in der Dimerisierung involvierte Regionen als graue Flächen gekennzeichnet [Pingoud & Jeltsch, 1997].

Gegenüber *Eco*RI verzerrt *Bam*HI die DNA während der spezifischen Bindung nicht. Das Enzym bildet mit seiner Erkennungssequenz zwölf direkte und sechs indirekte (wasservermittelte) Wasserstoffbrücken in der großen Grube aus, sowie zusätzlich drei direkte Wasserstoffbrücken in der kleinen Grube der DNA. Weiterhin werden auch van der Waals-Kontakte mit der Erkennungssequenz und Wasserstoffbrücken zum Phosphatrückgrat der DNA ausgebildet. Ein Großteil der Wasserstoffbrücken zum Phosphatrückgrat des einen DNA-Stranges wird von der Untereinheit gebildet

die mit den Basen des komplementären Stranges wechselwirkt, da das Enzym die DNA über Kreuz kontaktiert. Auf die Kontakte von *EcoRI* mit der Erkennungssequenz wird speziell unter 1.7 eingegangen.

Die Restriktionsendonuklease *EcoRV* entwindet, wie auch *EcoRI*, die DNA in der Mitte der Erkennungssequenz, indem sie die DNA in einem Winkel von 50° knickt. Analog zu *EcoRI* werden die *Stacking*-Wechselwirkungen der zentralen Basenpaare innerhalb der Erkennungssequenz aufgehoben. Dieser Prozeß hat eine Erweiterung der kleinen Grube, sowie die Verengung der großen Grube zur Folge und ermöglicht dem Enzym besseren Zugang zu den zu spaltenden Phosphodiesterbindungen. Die Basensequenzerkennung erfolgt hauptsächlich über zwei Erkennungsschleifen. Der *R-loop* bildet zwölf der achtzehn direkten Wasserstoffbrückenbindungen, zwei von der Waals-Kontakte, sowie zwölf wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat. Der glutaminhaltige *Q-loop* bildet vier Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen in der kleinen Grube. Zusätzlich befinden sich 24 Aminosäuren mit Donorfunktion oder einer positiven Ladung in räumlicher Nähe zum Phosphatrückgrat, so daß diese Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Die Restriktionsendonuklease *PvuII* zeigt große Strukturhomologien zur *EcoRV* (Abb. 6) [Athanasiadis *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995]. Das Enzym verzerrt, im Gegensatz zu *EcoRV* die DNA im Komplex mit der Erkennungsequenz nicht. Als Erkennungsmotiv dient *PvuII* ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, über das zwölf direkte Wasserstoffbrückenbindungen und einige von der Waals-Kontakte zu den Basen der Erkennungssequenz und dem Phosphatrückgrat ausgebildet werden.

1.5 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion

Um ihrer Aufgabe als Abwehrsystem gegen Fremd-DNA gerecht zu werden, muß *EcoRI* ihr Substrat spalten, bevor es von der zelleigenen Methylase durch Modifikation geschützt wird. Dafür ist eine schnelle Erkennung der spezifischen Sequenz vor einem großen Hintergrund unspezifischer Sequenzen notwendig. Das Enzym bindet dazu sein Substrat zunächst unspezifisch, da die spezifische Sequenz mit einem statistischen Verhältnis von 4095:1 deutlich unterrepräsentiert ist, und untersucht die DNA nachfolgend in eindimensionaler linearer Diffusion auf die Erkennungssequenz [Woodhead & Malcome, 1981]. Im Vergleich zur spezifischen

Bindung der Erkennungssequenz mit einer Bindungskonstante $K_{\text{ass}} \approx 10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (Nitrocellulose-Filterbindung) [Engler *et al.*, 1997], bzw. $K_{\text{ass}} = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Gel-Retardations-Assay) [Grabowski *et al.*, 1995], ist die unspezifische Bindung mit $K_{\text{ass}} \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$ [Langowski *et al.*, 1981; Terry *et al.*, 1983] schwach.

Die unspezifische Bindung zwischen DNA und Enzym wird durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt. Das Enzym umschließt mit seinen Armstrukturen die DNA und folgt der helicalen Windung der DNA auf der Suche nach der Erkennungssequenz [Jeltsch *et al.*, 1994a]. Eine Röntgenstruktur der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in unspezifischer Bindung zur DNA zeigt, daß lediglich fünf Kontakte zwischen Aminosäureresten des Proteins und Phosphatgruppen der DNA ausgebildet werden [Winkler *et al.*, 1993; Kostrewa & Winkler, 1995]. Ein vergleichbarer Kokristall von *EcoRI* in unspezifischer Bindung an DNA existiert nicht. Die Geschwindigkeit mit der das Enzym die DNA abtastet beträgt etwa $7 \times 10^6 \text{ Bp s}^{-1}$ [Ehbrecht *et al.* 1985], wobei während eines Bindungsereignisses des Enzymes mehrere Tausend Basenpaare untersucht werden. Sogenannte Starsequenzen werden von dem Enzym wesentlich besser gebunden als unspezifische DNA [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990], wodurch längere Pausen während der linearen Diffusion verursacht werden, ohne daß es jedoch zur Spaltung kommt [Jeltsch *et al.*, 1994].

Die Bedeutung einer optimalen linearen Diffusion wurde für das Restriktionsenzym *EcoRV* in *in vivo*-Experimenten mit Mutanten, deren Wechselwirkungen zum Phosphatrückgrat beeinträchtigt waren, untersucht. Hier konnte gezeigt werden, daß die Beeinträchtigung dieser Wechselwirkungen des Enzyms mit der abnehmenden Fähigkeit, eindringende Phagen abzuwehren, korreliert [Jeltsch *et al.*, 1996].

1.6 Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz

Eine entscheidende Voraussetzung für die Effektivität von Restriktionsendonukleasen ist ihre hohe Präzision in der Substraterkennung und Katalyse, da die Spaltung von anderen als den modifizierten Erkennungssequenzen dem Bakterium Schaden zufügt. Diese hohe Spezifität wird durch ein Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der DNA erreicht. Bei den Wechselwirkungen handelt es sich um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und der DNA, die

teilweise auch wasservermittelt sind, um van der Waals-Kontakte und um ionische Kontakte (Abb. 7).

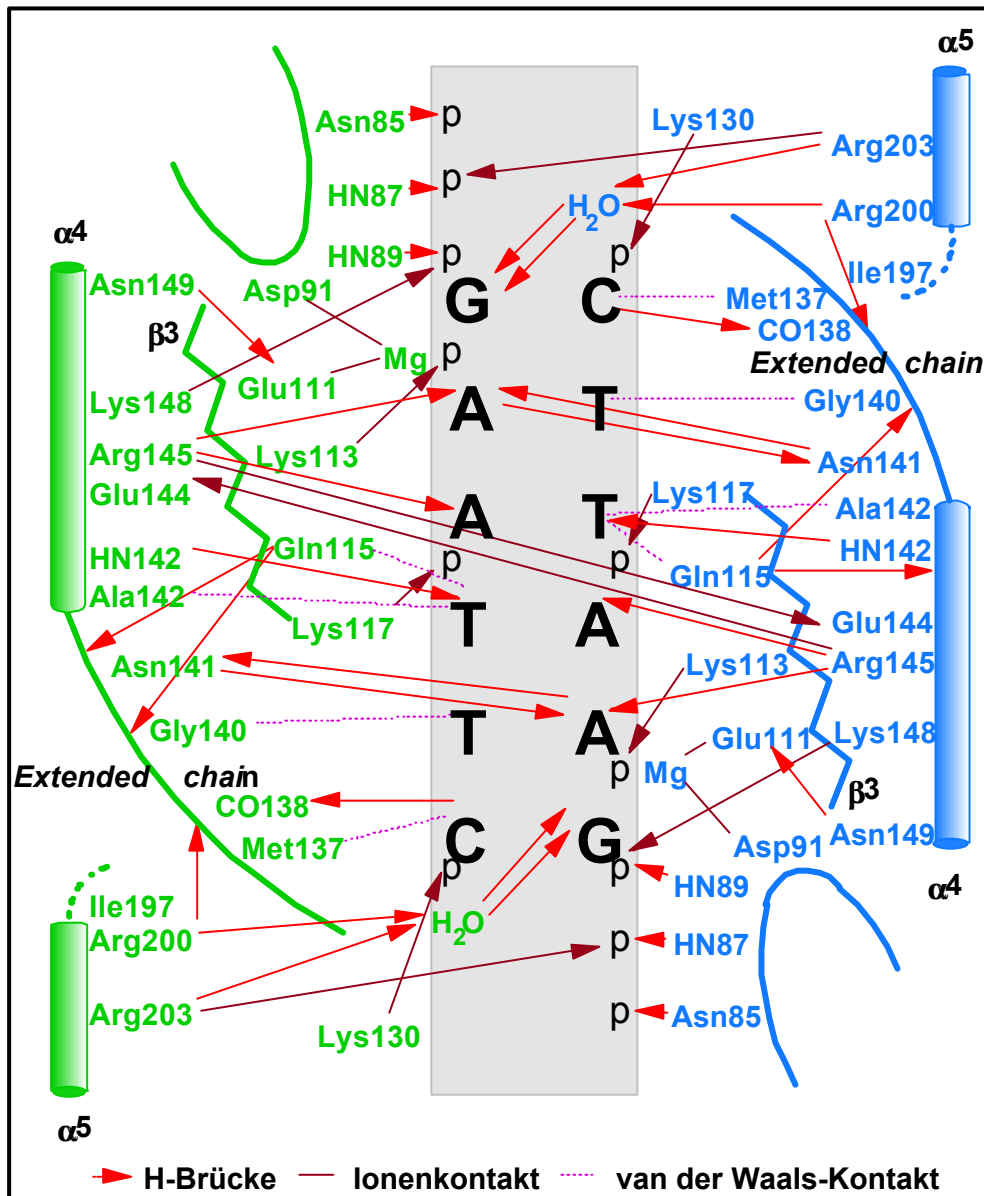


Abb. 7: Schematische Darstellung der Kontakte von *EcoRI* mit seiner Erkennungssequenz.

Für *EcoRI* liegt die Assoziationskonstante für die Bindung an die Erkennungssequenz $K_{\text{Ass, spez.}}$ um den Faktor $10^3 - 10^4$, sowie die intrinsische Geschwindigkeitskonstante für die Doppelstrangspaltung k_{cat} um den Faktor $10^2 - 10^6$ höher als für sogenannte Starsequenzen, d.h. Sequenzen die sich in einem Basenpaar von der kanonischen Sequenz unterscheiden [Thielking *et al.*, 1990]. Insgesamt bildet *EcoRI* 18 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und DNA aus, von denen 14 Protein-Purin und vier Protein-Pyrimidin-Wechselwirkungen sind.

Die Aminosäuren Arg200 und Arg203 bilden wasservermittelte Wasserstoffbrücken zu dem Guanin der Erkennungssequenz. Weiterhin werden eine Reihe von der Waals-Wechselwirkungen, wie hydrophoben Kontakte der Aminosäuren Gln115, Met137, Gly140 und Ala142 zu den Basen der Erkennungssequenz ausgebildet. Spezifische Kontakte zwischen dem Enzym und dem Phosphatrückgrat der DNA werden von den Positionen Lys130, Lys117, Asn 85 sowie der Peptidbindung von Ser87, Lys89 und Gly116 ausgehend geformt. Der Aminosäure Glu144 wird die zentrale Rolle der Vernetzung der an der Erkennung beteiligten Aminosäuren zugeschrieben, sie bildet Wasserstoffbrückenbindungen, wie auch ionische Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Asn141 und Arg203 derselben Untereinheit und den Aminosäuren Arg145 und Lys148 der anderen Untereinheit aus.

Aus Mutagenesestudien dieser Kontakte geht hervor, daß jeder der untersuchten Kontakte einzeln entfernt werden kann, ohne daß es zu einer verminderten Diskriminierung der Erkennungssequenz kommt, d.h. der Erkennungsprozeß der Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist hochredundant. Allerdings wird durch eine Substitution dieser Positionen häufig die Spaltaktivität vermindert [Alves *et al.*, 1989a; Geiger *et al.*, 1989; Heitman, 1992].

Abschließend soll die Rolle der zweiwertigen Kationen für die Substraterkennung und Spaltung betrachtet werden. Im allgemeinen benötigen Restriktionsendonukleasen keine zweiwertigen Kationen für die spezifische Bindung, einige Enzyme weichen allerdings von diesem Verhalten ab. Die Restriktionsendonuklease *EcoRV* bindet nur in Gegenwart zweiwertiger Kation spezifisch an ihre Erkennungssequenz, während in deren Abwesenheit nur unspezifische Bindung erfolgt. Gleiches Verhalten wurde auch für die *EcoRI*-Mutante K130E nachgewiesen [Windolph *et al.*, 1997]. Die Verwendung von Ca^{2+} ermöglicht die Untersuchung der Bindung ohne daß Spaltung erfolgt [Vipond & Halford, 1995; Engler *et al.*, 1997]. Für die Katalyse der Restriktionsendonukleasen spielen zweiwertige Kationen eine essentielle Rolle. Neben Magnesium und Mangan führen auch Kobalt und Nickel, allerdings mit sehr viel geringerer Effektivität, zu einer Spaltung der DNA [Woodhead & Malcolm, 1981; Vipond *et al.*, 1995].

1.7 Katalysemechanismus

In Abbildung 6 wurden bereits alle für die Katalyse wichtigen Aminosäuren der Restriktionendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV und *Pvu*II dargestellt. Eine eindeutige Zuordnung der Reste des katalytischen Zentrums in Verbindung zur DNA konnte jedoch nicht getroffen werden, da alle Kristalle in Abwesenheit des Kofaktors Magnesium gewonnen werden mußten (mit Ausnahme von *Eco*RV), um eine Spaltung der DNA zu verhindern. Unter Zuhilfenahme von weiteren biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen konnte aber eine detaillierte Vorstellung des molekularen Mechanismus der DNA-Spaltung gewonnen werden. Als möglicher Mechanismus für die DNA-Spaltung von *Eco*RI wurde das Modell der substratunterstützten Katalyse veröffentlicht [Jeltsch *et al.*, 1992]. Für *Eco*RV wurde dagegen ein weiterer Mechanismus der DNA-Spaltung, das Modell der Zwei-Metallionen-Katalyse postuliert [Kostrewa & Winkler, 1995], da aus dem Kokristall mit zweiwertigen Kationen teilweise zwei Metallionenbindungstaschen im katalytischen Zentrum bestimmt werden konnten. Eine vergleichende Darstellung beider Katalysemechanismen findet sich in Abbildung 8.

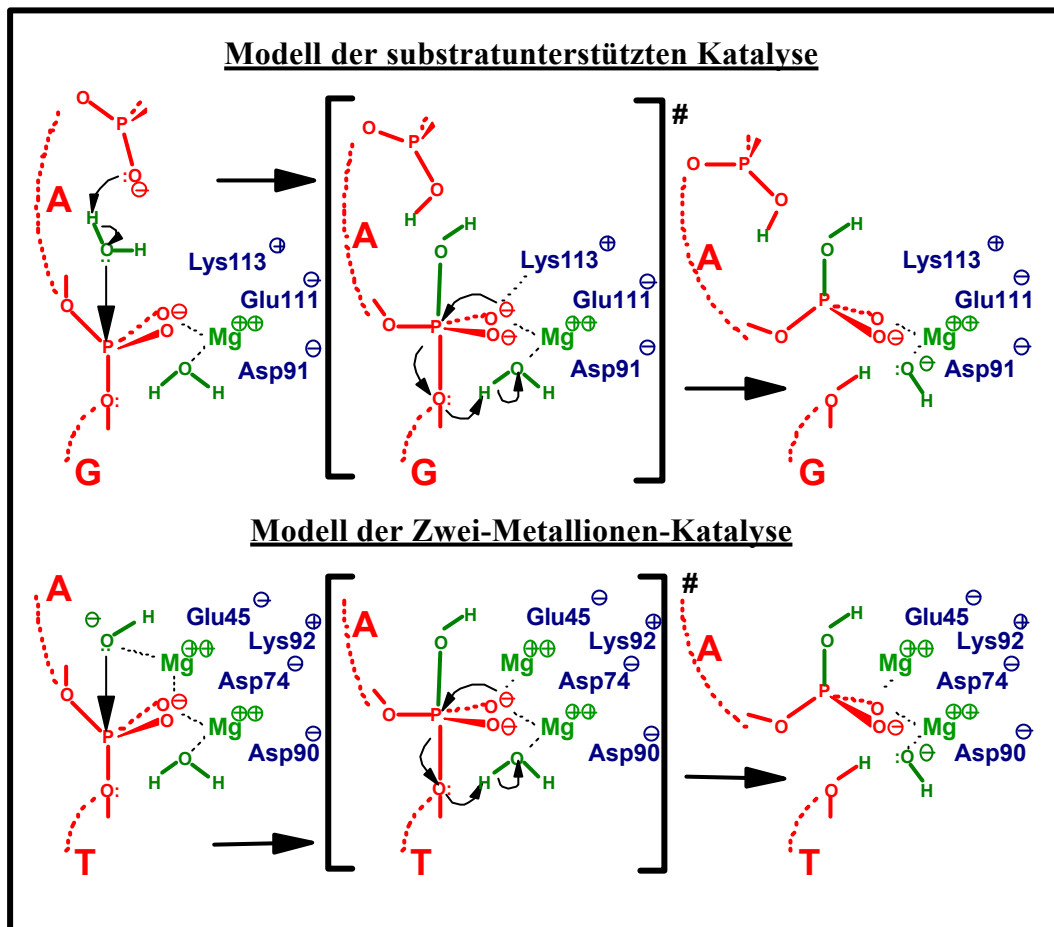


Abb. 8: Postulierte Modelle der Katalyse im Vergleich.

Die chemische Reaktion der DNA-Spaltung ist eine S_N2 -Reaktion bei der die zu spaltende Phosphodiesterbindung durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert wird. Das aktivierte Wassermolekül greift von der 3'-Seite aus an und ergibt ein 5'-Phosphat. Bei der substratunterstützten Katalyse abstrahiert die Phosphatgruppe, die der zu spaltenden Phosphatgruppe in 3'-Richtung direkt benachbart ist, ein Proton von einem Wassermolekül und steigert dessen Nukleophilie. Da für *EcoRI* keine Aminosäure in einer Position ist, um ein Wassermolekül zu aktivieren, wurde diese Funktion dem pro- R_P -Phosphorylsauerstoff dieser benachbarten Phosphatgruppe zugeschrieben. In Spaltexperimenten mit sogenannten *Missing phosphate*-Substraten wurde belegt, daß das Wasser auf diese Weise aktiviert wird [Jeltsch *et al.*, 1993b]. Danach verlangsamt sich die Spaltung bei der Verwendung von H-Phosphonaten an der beschriebenen Position um wenigstens vier Zehnerpotenzen. Die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung durch das aktivierte Wassermolekül erfolgt unter Inversion der Konfiguration der reaktiven Phosphatgruppe [Connolly *et al.*, 1984]. Die Elektrophilie des angegriffenen Phosphoratoms wird durch die

Polarisierung der nicht zum Phosphatrückgrat gehörenden P-O-Bindung, durch ein von den Aminosäuren Asp91 und Glu111 positioniertes Magnesiumion, gesteigert. Der Übergang der tetragonalen Geometrie des Phosphatesters in den trigonal bipyramidalen Übergangszustand wird dadurch erleichtert, daß ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe Teil der Koordinationssphäre des Magnesiumatoms wird [Heitman, 1992]. Die im Übergangszustand auftretende zusätzliche negative Ladung wird durch die basische Aminosäure Lys113 neutralisiert. Abschließend wird durch ein Wassermolekül aus der Koordinationssphäre des Mg^{2+} -Ions die Fluchtgruppe protoniert.

Für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV und *Pvu*II konnte die Bedeutung des Phosphates zur Aktivierung eines Wassermoleküls nachgewiesen werden. Weiterhin ist für *Eco*RI, *Eco*RV und *Pvu*II die Anwesenheit von zwei sauren und einer basischen Aminosäure, die für die Katalyse wichtig sind, erfüllt. *Bam*HI bildet mit drei essentiellen sauren Aminosäuren im katalytischen Zentrum eine Ausnahme [Xu & Schildkraut, 1991; Dorner & Schildkraut, 1994].

Die für *Eco*RV vorgeschlagene Zwei Metallionen-Katalyse (Abb. 8) setzt voraus, daß eine zweite Magnesiumbindungsstelle vorhanden ist. In den DNA-Kokristallen konnte diese Bindungsstelle nur teilweise nachgewiesen werden. Eine Bindungsstelle wird von den Aminosäuren Asp74 und Asp90 gebildet und die zweite von den Aminosäuren Asp74 und Glu45. Unterstützt wurde die Existenz der zweiten Bindungsstelle durch biochemische Experimente. So konnte die Spaltgeschwindigkeit in Gegenwart von Mn^{2+} durch Zugabe von Ca^{2+} erhöht werden, obwohl mit Ca^{2+} alleine keine Spaltung erfolgt [Vipond *et al.*, 1995]. Im Widerspruch dazu steht allerdings das Bindungsverhalten einer Tripelmutante in der Asp 90, Asp74 und Glu45 durch Alanin ersetzt worden sind [Jeltsch *et al.*, 1995]. Diese Mutante ist katalytisch inaktiv und bindet in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen DNA unspezifisch, in Anwesenheit dagegen spezifisch, was bedeutet, daß die spezifische DNA-Bindung von Mg^{2+} -Ionen induziert wird, die außerhalb des katalytischen Zentrums binden.

In der Zwei Metallionen-Katalyse wird das angreifende Wassermolekül durch eins der beiden Metallionen aktiviert, während das zweite eine P-O-Bindung im Phosphat polarisiert.

Für die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Pvu*II ist eine Zwei Metallionen-Katalyse nicht denkbar, da sich die möglichen Bindungspartner für ein zweites

Metallion (*EcoRI*: Asp59; *PvuII*: Glu55) als katalytisch unentscheidend erwiesen [Grabowski *et al.*, 1996; Nastri *et al.*, 1997].

1.8 Ziel der Arbeit

1.8.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für die Spezifität und katalytische Aktivität von *EcoRI*

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* bildet ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen und van der Waals-Wechselwirkungen zu seiner Erkennungssequenz GAATTC aus. Zum einen werden Kontakte zwischen dem Enzym und den Basen (*Direct readout*) und zum anderen zwischen dem Enzym und dem Phosphatrückgrat (*Indirect readout*) ausgebildet. Im ersten Teil dieser Arbeit soll die Bedeutung von Phosphatkontakten für die spezifische DNA-Bindung und Katalyse untersucht werden. Von den gemäß der Kokristallstruktur möglichen Phosphatkontakten der Aminosäuren Lys130, Lys117, Asn85 sowie der Peptidbindung von Ser87, Lys89 und Gly116 werden speziell die Kontakte an den Positionen Lys117 und Lys130 untersucht.

1.8.1.1 Nachweis einer Me^{2+} -Bindungstasche in unmittelbarer Umgebung der *Inner arm*-Region der Mutante K130E

Ausgehend von dem charakteristischen Verhalten der Mutante K130E [Windolph *et al.*, 1997], die die Anlagerung zweiwertiger Kationen außerhalb der Erkennungssequenz braucht, um DNA zu binden und zu spalten, soll in dieser Arbeit untersucht werden, wo diese potentielle Metallionen-Bindungsstelle lokalisiert ist.

1.8.1.2 Nachweis eines Phosphatkontaktes an der Position Lys117

Der postulierte Phosphatkontakt zur DNA an der Position Lys117 soll gezielt durch Ladungsentfernung, Einführung von Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können, Einführung von Aminosäuren mit entgegengesetzter Ladung und auch Aminosäuren mit unterschiedlichem Platzbedarf untersucht werden. Es soll die mögliche Interaktion der Position 117 mit dem Phosphatrückgrat in der Mitte der Erkennungssequenz zwischen dem Adenin und Thymin destabilisiert werden. In Bindungs- und Spaltexperimenten sollen die Auswirkungen dieser Destabilisierung untersucht werden.

1.8.1.3 Untersuchungen von Phosphatkontakten des wtEcoRI und der K117-Mutanten mit modifizierten Oligonukleotiden

Um Aussagen über die Bedeutsamkeit bestimmter Phosphatkontakte für die spezifische Sequenzerkennung von *EcoRI* zu treffen, sollen Spalt- und Bindungsexperimente mit Methylphosphonat-Oligonukleotiden durchgeführt werden. Jedes Phosphat innerhalb der Erkennungssequenz und direkt an die Erkennungssequenz anschließend wird dazu in R- und S-Konfiguration modifiziert.

1.8.2 Erweiterung der Spezifität von *EcoRI*

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die Spezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erweitert werden. Aus *EcoRI* soll durch zielgerichtete Mutagenese ein Enzym generiert werden, daß eine auf jeder Seite um ein Basenpaar erweiterte *EcoRI*-Erkennungssequenz spezifisch bindet und spaltet. Das Ziel ist die Erzeugung eines Restriktionsenzym mit einer definierten acht Basenpaare langen Erkennungssequenz.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Bei den im Verlauf der Arbeit verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um Abkömmlinge des *E. coli*-Stammes K12.

WK6mutS(λ):

Genotyp: $r_k^- m_k^+$, $\Delta[lac\ proAB]$, *galE*, *strA*, *mutS*215, Tn10[F', *proAB*, *lacI*^q γ Z Δ M15], λ^+ .

Der Stamm dient zur Vermehrung von *Mismatch*-Plasmiden aus der *Gapped-duplex*-Mutagenese. Das für die *Mismatch*-Reparatur verantwortliche chromosomale *mutS*-Gen wurde durch das Transposon Tn10 zerstört, weshalb dieser Stamm Basenfehlpaarungen nicht reparieren kann. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen λ -lysogenen Stamm, der den λ -Repressor *cl* konstitutiv exprimiert. Dadurch werden durch einen P_L-Promotor kontrollierte Gene reprimiert.

LK111(λ):

Genotyp: $r_k^- m_k^+$, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI*^q γ Z Δ M15, *Hfr*, λ^+

Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen λ -lysogenen Stamm, der den λ -Repressor *cl* konstitutiv exprimiert. Dieser Stamm wird zur Vermehrung von Plasmid-DNA eingesetzt [Zabeau *et al.*, 1982].

TGE900(pEcoR4):

Genotyp: $r_k^- m_k^+$, *su-1*, *ilv-1*, *bio*[λ *cl*857 Δ *Bam*HI].

Dieser λ -lysogene Stamm wird zur Expression von Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verwendet. Der Stamm exprimiert eine thermosensitive Mutante des λ -Repressors (*cl*857). Oberhalb von 42°C liegt dieser Repressor als bindungsinaktives Monomer vor, womit eine Expression eines plasmidkodierten Genes unter Kontrolle des P_L-Promotors durch Temperaturerhöhung induziert werden kann [Bottermann & Zabeau, 1985]. Zum Schutz des zellulären Genoms (vor der Restriktion) während der Expression von

EcoRI, enthält dieser Stamm zusätzlich das Plasmid pEcoR4. Dieses kodiert für die zu *EcoRI* korrespondierende Methylase und verhindert so die toxische Wirkung des exprimierten Genproduktes *EcoRI*.

2.1.2 Verwendete Vektoren

In dieser Arbeit werden folgende kommerziell erhältliche oder als Laborpräparate vorliegende Vektoren verwendet:

pRIF309+ (5068bp) [Wolfes *et al.*, 1986]:

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein pBR322-Derivat. Für die Replikation besitzt das Plasmid den ColE1-Replikationsursprung (*Ori*); weiterhin liegt für die Erzeugung einer einzelsträngigen Form der Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1 vor. pRIF309+ trägt das β -Lactamasegen, daß durch den Tn903-Tet^R-Promotor konstitutiv exprimiert wird. Dadurch verfügen die plasmidhaltigen Zellen über eine Ampicillin-Resistenz.

Das auf dem Plasmid liegende *ecoRI*-Gen wird durch den p_L-Promotor und den fd-Terminator kontrolliert. Mit diesem System können toxische Gene gut in *E. coli*-Zellen, die den λ cl-Repressor produzieren, gehalten werden. pRIF309+ dient als *Template* während der PCR-Mutagenese (2.2.1.2).

pRIF309+(His₆) (5068bp) [Rotzal, 1992]:

Dieses Plasmid entspricht weitgehend pRIF309+. Zusätzlich wurden der codierenden Sequenz des *ecoRI*-Genes am C-Terminus sechs Histidinreste angehängt, um das Genprodukt über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix (2.3.4.1) aufzureinigen zu können. Das Plasmid wird zur Mutagenese und Expression von *EcoRI*-Mutanten verwendet.

pBR322 (4361bp):

Das Plasmid setzt sich aus dem *Ori*- und *rop*-Gen-Anteil des ColE1-Derivates pMB1, dem Ampicillin-Resistenzgen aus Tn3 und dem Tetracyclin-Resistenzgen aus pSC101 zusammen. In dieser Arbeit wird das Plasmid als *Template* für eine PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten für Bindungsstudien (2.4.4) eingesetzt.

pUC8 (2665bp) [Vieira & Messing, 1982; Pouwels *et al.*, 1985]:

pUC8 ist ein käuflicher Klonierungsvektor mit ColE1-Replikationsursprung und einem Ampicillin-Resistenzgen. In dieser Arbeit wird das Plasmid für kinetische Spaltexperimente (2.4.2) verwendet.

2.1.3 Kompetente Zellen

Im Verlauf dieser Arbeit werden verschiedene Methoden benutzt, um kompetente Zellen herzustellen. Neben elektrokompenten Zellen werden chemisch kompetente Zellen nach der TSS-Methode [Chung *et al.*, 1989] und nach der RbCl-Methode [Hannahan, 1983] hergestellt. Im folgenden wird die RbCl-Methode beschrieben, mit welcher Kompetenzen von $>10^7$ cfu/ μ g erreicht werden können.

Aus einer Übernachtskultur in Luria-Bertani-Medium (LB) wird unter Zusatz von 20mM MgSO₄ eine 100ml-Kultur angeimpft. Die Zellen werden in der frühlogarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀: 0,4 bis 0,6) sedimentiert. Das Zellpellet wird in 0,4 Volumenanteilen TFB1 resuspendiert. Die folgenden Schritte werden unter Eiskühlung durchgeführt. Die Lösung wird für 5min auf Eis inkubiert und anschließend für 5min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1/25 des Originalvolumens TFB2 resuspendiert, 45min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen zu je 100 μ l-Fractionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen können bei -70°C bis zu einem Jahr gelagert werden.

Luria-Bertani-Medium:	10g	Caseinhydrolysat (Gibco-BRL)
	10g	Hefeextrakt (Gibco-BRL)
	5g	NaCl
	ad1l dd H ₂ O; pH 7,5 einstellen	

TFB1	30mM	K-Acetat
	100mM	RbCl
	10mM	CaCl ₂
	50mM	MnCl ₂
	15%	Glycerin

pH8,5; einstellen mit 0,1M Essigsäure, sterilfiltrieren

TFB2	10mM	Mops oder Pipes
	75mM	CaCL ₂
	10mM	RbCl
	15%	Glycerin
pH 6,5; einstellen mit 0,1MKOH, sterilfiltrieren		

2.1.4 Transformation

Ein 100µl-Aliquot der kompetenten Zellen wird auf Eis aufgetaut und mit etwa 1-10ng DNA (in maximal 10µl Volumen) versetzt. Der Reaktionsansatz wird für 45min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2min bei 42°C und eine weitere zweiminütige Inkubation auf Eis. Der Transformationsansatz wird danach mit 900µl LB-Medium verdünnt und für ca. eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden nach Zentrifugation (3500rpm, 10min) in ca 100 µl (Restvolumen des abgegossenen Überstands) LB-Medium resuspendiert und auf Selektivplatten (Tab. 1) ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgt über Nacht bei 37°C. Für den Stamm TGE900(p*EcoR4*) wird zur Transformation mit pRIF309+(His₆) ein Hitzeschock bei 37°C vorgenommen und anschließend bei 30°C bebrütet, um einer vorzeitigen Expression des *ecoRI*-Gens vorzubeugen.

Antibiotikum	Flüssigmedium	Festmedium
Ampicillin	75µg/ml	100µg/ml
Chloramphenicol	20µg/ml	30µg/ml

Tab. 1: Antibiotikakonzentrationen im Selektivmedium.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die Präparation von Plasmiden, die Elution von DNA aus Agarosegelen und die Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten werden Kits der Firma Qiagen, entsprechend der beigefügten Protokolle verwendet. Alle verwendeten Enzyme werden nach den Angaben der Hersteller angewendet.

2.2.1 Mutagenesestrategien

Für die zielgerichtete Herstellung der *EcoRI*-Mutanten werden die *Gapped-duplex*-Methode [Kramer *et al.*, 1984], sowie die PCR-Mutagenese nach Baretino *et al.* (1993) verwendet.

2.2.1.1 *Gapped-duplex*-Mutagenese

Um spezifisch eine Mutation in das auf dem pRIF309+(His₆) liegende *ecoRI*-Gen einzuführen, wird ein Mutagenese*primer* benötigt, der die gewünschte Mutation trägt und zusätzlich eine stille Mutation (die Aminosäuresequenz bleibt trotz veränderter Basensequenz erhalten) in das *ecoRI*-Gen einführt, die gleichzeitig eine vorhandene Restriktionsspaltstelle zerstört oder eine neue Restriktionsspaltstelle erzeugt. Die Spaltstelle dient zur ersten Überprüfung des Mutageneseerfolges und wird als *Screeningsite* bezeichnet. Der *Primer* wird auf eine einzelsträngige Plasmid-DNA von pRIF309+(His₆), (gewonnen aus Superinfektion der plasmidhaltigen Bakterienzelle mit f1-Phagen) hybridisiert (vor der Hybridisierung muß der synthetisch hergestellte *Primer* phosphoryliert werden)(Abb. 9). Zusätzlich wird möglichst eng um den Mutagenesebereich ein Mutageneserahmen hybridisiert, welcher die Bereiche, die in der Auffüllreaktion (*Fill in*) neusynthetisiert werden müssen, möglichst klein hält. Der Mutageneserahmen wird aus doppelsträngigem pRIF309+(His₆) in einer Spaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen erhalten. Zur Hybridisierung werden die drei beschriebenen Komponenten bei 95°C für 5min inkubiert, anschließend wird das Gemisch langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die einzelsträngigen Bereiche zwischen dem Mutageneserahmen und *Primer* werden durch T7 DNA-Polymerase aufgefüllt und durch T4 DNA-Ligase kovalent geschlossen. Mit dem entstandenen *Mismatch*-Plasmid werden Zellen des reparaturdefizienten Stammes WK6mutS(λ) transformiert (2.1.4). Da nur ein Strang des mutierten Plasmides die über die Mutagenese*primer* eingeführten Mutationen trägt, besitzen nach *in vivo*-Amplifikation nur 50% der Tochterplasmide die gewünschte Mutation. Der gesamte Plasmidpool wird nach seiner Isolierung mit dem *Screeningenzym* gespalten. Mit dem Teil, der *screening* positiv ist (ggf. nach Religation), werden LK111(λ)-Zellen transformiert. Anschließend werden einzelne Klone erneut durch Restriktionsspaltung mit dem *Screeningenzym* untersucht und positive Klone sequenziert (2.2.3). Mit Hilfe der

Gapped-duplex-Mutagenese wurden die unter 3.1.1.1 vorgestellten Mutanten hergestellt.

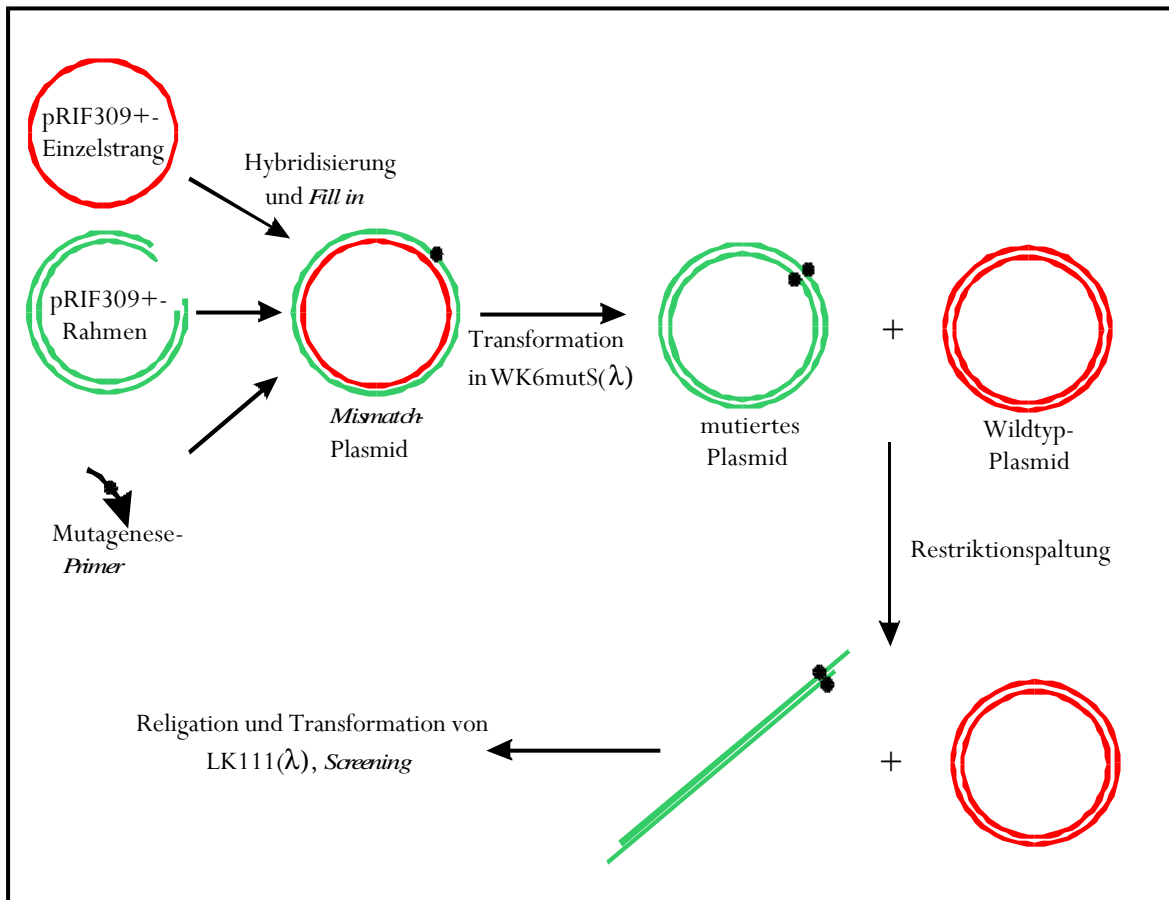


Abb. 9: Reaktionsverlauf einer *Gapped-duplex*-Mutagenese mit Einführung einer Restriktionspaltstelle.

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

<i>Fill in</i> -Puffer	27,5 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	67,5 mM	KCl
	15mM	MgCl
	2mM	DTE
	50 μ M	ATP
	je 25 μ M	dATP, dTTP, dGTP, dCTP

2.2.1.2 PCR-Mutagenese

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Mullis & Falcona, 1989], einer *in vitro* Amplifikationsmethode von definierten DNA-Sequenzen, wird in der PCR-Mutagenese über einen spezifischen Mutageneseprimer gezielt eine Mutation in beide Stränge des *ecoRI*-Gens eingebracht. Die von Baretino *et al.* (1993) entwickelte Methode der PCR-Mutagenese (Abb. 10) verläuft in zwei Teilschritten. In dem ersten Abschnitt wird über eine PCR die Mutation in das *ecoRI*-Gen eingeführt, in dem zweiten Abschnitt wird das gesamte mutierte *ecoRI*-Gen amplifiziert.

In der ersten PCR wird ein verkürztes Fragment des *ecoRI*-Gens, welches vom Mutageneseprimer bis zum Genende reicht, amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthält den Mutageneseprimer M, der eine stille Mutation zum *screening* und die gewünschte Mutation trägt, sowie dem Primer A (Tab. 2), der auf dem His₆-tag des *ecoRI*-Gen und angrenzenden Bereichen hybridisiert. Als *Template* für diese erste PCR dient pRIF309+(His₆). Das so erzeugte DNA-Fragment wird *Megaprimer* genannt. Das DNA-Fragment aus der ersten PCR dient als Primer in der zweiten PCR. In dieser Reaktion werden gleichzeitig, zusätzlich die Primer A und B (Tab.2), sowie pRIF309+ (ohne His₆) als *Template*, eingesetzt. Zu Beginn der Reaktion wird dabei mit einer schlechten Ausbeute ein Produkt zwischen dem Primer B und dem *Megaprimer* gebildet. Der Grund für die schlechte Ausbeute ist die große Längendifferenz zwischen den beiden *Primern*. Dieses Produkt wird anschließend mit den gleich langen Primern A und B von der *Pfu* DNA-Polymerase mit guter Ausbeute amplifiziert. Da in dieser Reaktion pRIF309+ (ohne His₆) als *Template* verwendet wird, ist eine Amplifikation des Wildtyp *ecoRI*-Gens zwischen den Primern A und B nicht möglich. Erst auf dem DNA-Fragment das zwischen Primer B und dem *Megaprimer* M gebildet wird und neben den Mutationen über den *Megaprimer* auch wieder den Histidin-Tag trägt, kann der Primer A hybridisieren. Das mutierte *ecoRI*-Gen wird über eine Qiaquick-Säule von Qiagen aufgereinigt und in das Plasmid pRIF309+(His₆) kloniert.

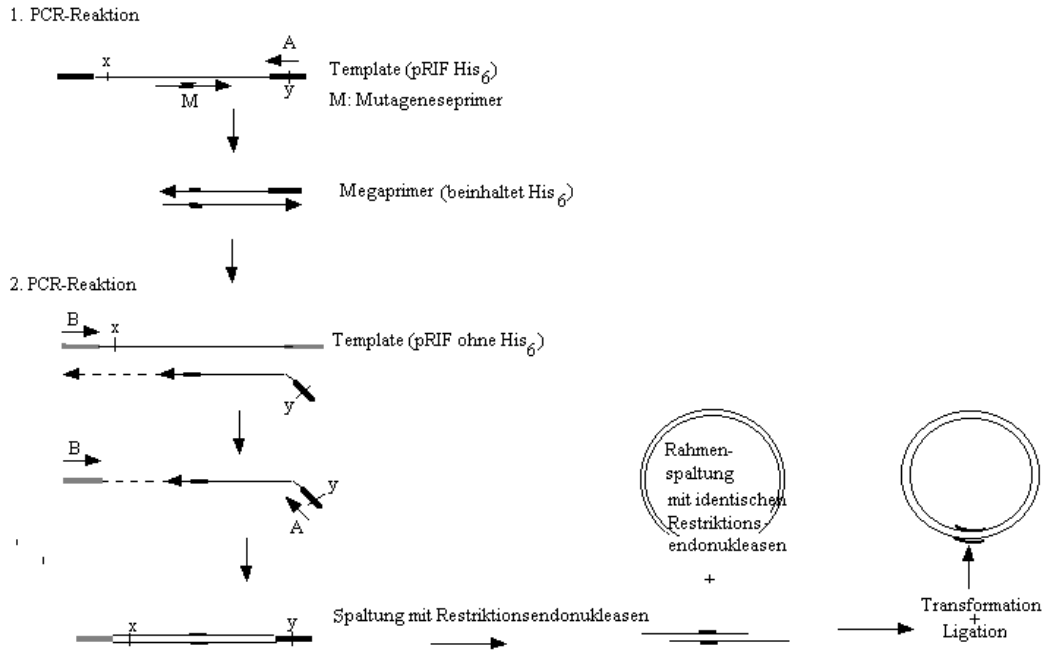


Abb 10.: Strategie der PCR-Mutagenese.

Primer	Sequenz
Primer A	GTGATGGTGATGGTGATGCTTACTA
Primer B	ACGAGGCAGACCTCAGCGCCGGTG

Tab. 2: Sequenz der *Primer A* und *B* für die PCR-Mutagenese.

Ansatz der 1. PCR:

5µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
5µl	2mM dNTPs
1µl	50µM <i>Primer A</i>
1µl	50µM Mutageneseprimer
1µl	pRIF309+(His ₆) (100ng/µl, linearisiert mit <i>PvuI</i>)
1µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (nativ, 2,5U/µl, Firma Stratagene)
35µl	dd H ₂ O

Nach der ersten PCR wird das amplifizierte DNA-Fragment (*Megaprimer*) mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt und in 50µl TE aufgenommen.

Ansatz der 2. PCR:

5µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
5µl	2mM dNTPs
1µl	50µM <i>Primer A</i>
1µl	50µM <i>Primer B</i>
5µl	<i>Megaprimer</i>
1µl	pRIF309+(ohne His ₆) (100ng/µl, linearisiert mit <i>PvuI</i>)
1µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (nativ, 2,5U/µl, Firma Stratagene)
31µl	dd H ₂ O

Auch das DNA-Fragment der zweiten PCR wird nach der Reaktion mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt.

	Temperatur [C°]	Wechselzeit [C°/s]	Reaktionszeit [s]
Denaturierung 1x	92	3	300
Amplifikation 30 x	45	3	90
	72	3	60
	92	3	60
finale Extension 1 x	45	3	90
	72	3	400

Tab. 3: PCR-Programm für die erste und zweite PCR der PCR-Mutagenese.

Der Vorteil der PCR-Mutagenese gegenüber der *Gapped-duplex*-Mutagenese liegt in dem geringeren Zeitaufwand der Methode, sowie der Möglichkeit auf einfache Weise auch Mehrfachmutanten zu generieren, deren Mutationen weiter voneinander entfernt sind. Bei einer *Gapped-duplex*-Mutagenese würde dieses eine oder mehrere Einzelstrangpräparationen im Prozessverlauf voraussetzen, sofern eine Zusammenklonierung von Mehrfachmutanten aus Einzelmutanten aufgrund mangelnder Schnittstellen nicht möglich ist.

Für die PCR-Reaktionen wird *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzt, um eine möglichst hohe Synthesegenauigkeit zu erzielen. Die Fehlerrate der *Pfu* DNA-Polymerase liegt durch ihre *Proofreading*-Aktivität bei 1/6000, wogegen die *Taq* DNA-Polymerase eine Fehlerrate von 1/500 aufweist [Saiki *et al.*, 1988]. Das aufgereinigte Produkt der

zweiten PCR wird mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Spe*I gespalten und in einen entsprechenden Rahmen des Plasmides pRIF309+(His₆) kloniert.

2.2.2 Mutageneseprimer

Die Angabe der in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer erfolgt in 5'→3'-Richtung. Die in der DNA vorgenommenen Basenaustausche sind fett gedruckt und die *Screeningspaltstellen* die zugefügt (+) oder entfernt (-) werden sind unterstrichen.

Aminosäureposition 117:

K117A	GCTGAAGCCAAACAT <u>TCAAGGT</u> GC AGATATTATAAATATAAGG (- <i>Styl</i>)
K117E	GCTGAAGCCAAACAT <u>TCAAGGT</u> GA AGATATTATAAATATAAGG (- <i>Styl</i>)
K117L	GCTGAAGCCAAACAT <u>TCAAGGT</u> TTA AGATATTATAAATATAAGG (- <i>Styl</i>)

Aminosäurepositionen 130, 133 und 135:

K130E/D133A	TTGTTAGTTGGG GA AGAGGAG GCT CAAGATTTAATGGCAGCTG GTAATGCT (+ <i>Pvu</i> II)
K130E/D135A	TTGTTAGTTGGG GA AGAGGAGATCA AGCT TTAATGGCAGCTG GTAATGCT (+ <i>Pvu</i> II)
K130E/D133A D135A	TTGTTAGTTGGG GA AGAGGAG GCT CA AGCT TTAATGGCAGCTG GTAATGCT (+ <i>Pvu</i> II)

Aminosäureposition 197:

I197E	GTTGTTAAT <u>CTCGAGT</u> TATAATTCTGGT CA ATTAAATAGGTTA (+ <i>Xho</i> l)
I197Q	GTTGTTAAT <u>CTCGAGT</u> TATAATTCTGGT GA ATTAAATAGGTTA (+ <i>Xho</i> l)
I197R	GTTGTTAAT <u>CTCGAGT</u> TATAATTCTGGT AG ATTAAATAGGTTA (+ <i>Xho</i> l)

Die Doppelmutanten A142G/I197E, A142G/I197Q und A142G/I197R werden mit Hilfe der PCR-Mutagenese (2.2.1.2) hergestellt. Dazu wird in der ersten PCR mit dem Mutagensesprimer A142G, sowie dem *Primer A*, auf den bereits hergestellten Plasmiden der Mutanten I197E, I197Q und I197R als *Template*, der Megaprimer amplifiziert. Die Mutation an Position 142 wird über den Mutageneseprimer und die Mutation an der Position 197 über das *Template* eingeführt.

A142G	ATGGCTGCTAAT GG TATCGAAC <u>GTTCTC</u> ATAAGAATATATCA (- <i>Bgl</i> II)
-------	---

Die Doppelmutanten A138D/I197Q und A138N/I197Q werden ebenfalls über PCR-Mutagenese nach dem oben beschriebenen Prinzip hergestellt. Als Mutageneseprimer werden Primer A138D oder A138N und als *Template* die bereits vorhandene Plasmid-DNA der Mutante I197Q verwendet.

A138D	CAAGATTTAATG GAT GCTGGTAATGCTATCGAA <u>AGGTCTC</u> ATAA GAAT (- <i>Bgl</i> II)
A138N	CAAGATTTAATG AAT GCTGGTAATGCTATCGAA <u>AGGTCTC</u> ATAA GAAT (- <i>Bgl</i> II)

Die Dreifachmutanten A138N/N141A/I197Q, und A138N/N141S/I197Q werden entsprechend der obigen Angaben mit den Mutageneseprimern A138N/N141A und A138N/N141S hergestellt

A138N/N141A	CAAGATTTAATG AAT GCTGGT GCT GCTATCGAAAGGTCTCATAA GAAT (- <i>Bg</i> II)
A138N/N141S	CAAGATTTAATG AAT GCTGGT AGT GCTATCGAAAGGTCTCATAA GAAT (- <i>Bg</i> II)

Für die PCR-Mutagenese der Doppelmutante M137Q/A138N, sowie der Dreifachmutanten M137Q/A138N/I197Q und M137Q/A138N/I197R werden als *Template* in der ersten PCR pRIF309+(His₆), sowie die Plasmid-DNA der Mutanten I197Q und I197R und der Mutagenesprimer M137Q/A138N verwandt.

M137Q/A138N	GATCAAGATTTA CAGAAT GCTGGTAATGCTATCGAAAGGTCTCA TAAGAAT (- <i>Bg</i> II)
-------------	---

Insertionsmutanten um die Position 197:

Bei der Mutante GlyA/I197Q wird zwischen den Positionen 196 und 197, bei der Mutante GlyB/I197Q zwischen den Positionen 197 und 198 und bei der Mutante GlyAB/I197Q zwischen beiden Positionen ein Glycincodon inseriert. Sie werden ebenfalls, wie beschrieben, mit Hilfe der PCR-Mutagenese hergestellt.

GlyA/I197Q	GTTGTTAAT <u>CTCGAG</u> TATAATTCTGGT GGTCAAT TAAATAGGTT A (+ <i>Xho</i> I)
GlyB/I197Q	GTTGTTAAT <u>CTCGAG</u> TATAATTCTGGT CAAGG TTAAATAGGTT A (+ <i>Xho</i> I)
GlyAB/I197Q	GTTGTTAAT <u>CTCGAG</u> TATAATTCTGGT GGTCAAGG TTAAATAG GTTA (+ <i>Xho</i> I)

Die Insertionsmutanten A142G/GlyAB/I197Q und A138N/GlyAB/I197Q werden in einer PCR-Mutagenese mit der Plasmid-DNA der Mutante GlyAB/I197Q als *Template* der ersten Reaktion, sowie den Mutageneseprimern A142G und A138N generiert.

2.2.3 Sequenzierung (modifizierte Arbeitsvorschrift von Pharmacia)

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgt nach der Didesoxymethode von Sanger [Sanger & Coulson, 1977], unter Verwendung einer modifizierten Arbeitsvorschrift von Pharmacia. Auf eine doppelsträngige DNA wird ein 15-20 Basen langer *Primer* hybridisiert, der dann von einer DNA-Polymerase verlängert wird. Zu Beginn der Reaktion wird die doppelsträngige DNA durch alkalische Behandlung denaturiert und in einer *Annealing*-Reaktion anschließend der *Primer* auf das nun einzelsträngige DNA-Template hybridisiert. In der darauf folgenden Markierungsreaktion wird radioaktives [α -³⁵S]dATP in die DNA eingebaut, um später die entstandenen DNA-Fragmente autoradiographisch nachweisen zu können. Der Abbruch der Sequenzierreaktion wird in der Terminationsreaktion durch Zugabe von Didesoxynukleotiden bewirkt, wodurch ein Kettenabbruch mit spezifischen 3'-Enden erreicht wird und statistisch unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgrund ihrer Länge aufgetrennt werden können.

Im folgenden wird nur der Verlauf der Sequenzierung wiedergegeben; Einzelheiten über die Pufferzusammensetzungen des *Annealing*-Puffer, *Labelling*-Mix, Terminationsgemisches, Auftragspuffer, sowie der Lösungen für das Sequenziergel sind bei Rosati (1996) beschrieben.

2.2.3.1 Annealingreaktion

Die doppelsträngige DNA sollte frei von Proteinen und Salz sein und überwiegend in der *supercoiled* Form vorliegen.

Um die DNA alkalisch zu denaturieren, versetzt man 8 μ l (1,5-2 μ g) Plasmid-DNA mit 2 μ l 2M NaOH und inkubiert für 10min bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation werden dann 3 μ l Na-Acetat (pH4,5) und 7 μ l ddH₂O zugegeben. Durch die Zugabe

von 60µl eiskaltem 100%igem Ethanol wird die DNA gefällt (-70°C für 15min oder 20°C für 30min). Nach 10min Zentrifugation bei 12000rpm, vorsichtigem Entfernen des Überstandes, Resuspendieren in 70% Ethanol (eiskalt), erneuter Zentrifugation (10min, 12000rpm) und Entfernen des Überstandes, wird das DNA-Pellet kurz im Vakuum getrocknet und dann in 10µl ddH₂O aufgenommen.

Diese Lösung wird nach Zusatz von

2 µl	Annealingpuffer
2 µl	Primer (7-10ng)

20min bei 37°C inkubiert. Danach wird sie für 10min bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die *Annealing*ansätze können sofort benutzt oder auch bei -20°C aufbewahrt werden. Sie sollten vor der endgültigen Verwendung kurz anzentrifugiert werden, damit sich die Lösung am Gefäßboden befindet.

2.2.3.2 Markierungsreaktion

Zu dem *Annealing*ansatz werden 2µl *Labelling*-Mix, 1µl 0,3M DTT, 1µl [α -³⁵S]dATP und 2µl verdünnte T7 DNA-Polymerase (1,5U/µl) pipettiert. Diese Lösung wird vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt, kurz anzentrifugiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.3 Terminationsreaktion

Der *Labelling*-Ansatz wird in vier parallele Ansätze von je 4,5µl geteilt, welchen zusätzlich zu den normalen Desoxynukleotiden eine der vier Basen als Didesoxynukleosidtriphosphat zugefügt wird. Wird während der Synthese ein Didesoxynukleosidtriphosphat in den DNA-Strang eingebaut, erfolgt ein Kettenabbruch der DNA-Synthese. Das Verhältnis von Desoxy- zu Didesoxy-Molekülen des entsprechenden Nukleotides entscheidet über die mittlere

Kettenlänge. 2,5µl des Terminationsgemisches werden auf 37°C temperiert, bevor die 4,5 µl des Labelling-Ansatzes zugegeben werden. Die Reaktion wird nach genau 5min durch Zugabe von 5µl Sequenzierauftragspuffer beendet. Je 2µl der so erhaltenen Lösung werden pro Geltasche auf das Sequenziergel aufgetragen. Dabei ist darauf zu achten das der Ansatz vor dem Auftrag für 5min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgeschreckt wird. Der Rest des Ansatzes kann bei -20°C für weitere Sequenziergele aufbewahrt werden.

2.2.3.4 Sequenziergel

Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente werden in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, wozu 6%ige Polyacrylamidgele in TBE oder in TTE-Puffer unter Zusatz von 6M Harnstoff eingesetzt werden.

Nach der Beladung des Sequenziergels mit Sequenzierauftragspuffer wird bei 1500V unter Temperierung auf 52°C, für 45min ein Vorlauf durchgeführt. Dann werden die vorher für 5min auf 95°C erhitzten und auf Eis abgeschreckten Proben aufgetragen, wobei die Geltaschen zuvor von Harnstoff und Gelresten freigespült werden sollten. Der Hauptlauf wird nach ca. 2h beendet, wenn die Bromphenolbande das Gelende erreicht hat.

Damit der Harnstoff aus dem Gel herausdiffundieren kann, wird es anschließend für gut 2h in 10%iger Essigsäure gelagert und danach ca. 1h bei 65°C getrocknet. Die Detektion der Banden erfolgt durch Autoradiographie (Kodak-Film, BioMax MR-1) über einen Zeitraum von 12-18h bei Raumtemperatur.

2.3 Proteinchemische Arbeiten

2.3.1 Expressionstest

Mit den im Verlauf der Arbeiten erhaltenen mutierten *ecoRI*-Genen werden TGE900(pEcoR4)-Zellen (2.1.1) transformiert und mit einem der gewonnenen Klone eine 5ml LB-Kultur angeimpft. Dem Nährmedium werden als Selektionmarker sowohl Ampicillin, als auch Chloramphenicol zugefügt. Sobald sich die Zellen in der

exponentiellen Wachstumsphase befinden werden zur Wachstumssteigerung 200µl 20%ige (w/v) Glucose, dazugegeben und die Temperatur zur Induktion der Expression auf 42°C erhöht. Nach 2h Wachstumszeit wird die Proteinexpression auf einem Laemmli-Gel (2.3.5) überprüft.

2.3.2 Fermentation

Zur Gewinnung größerer Proteinmengen der *EcoRI*-Mutanten wird eine Fermentation im 10l-Maßstab durchgeführt. Die Expression der Proteine erfolgt in TGE900(pEcoR4)-Zellen (2.1.1).

Zu Beginn wird das Fermentationsgefäß mit ca. 8l Wasser beschickt und über Nacht bei 120°C sterilisiert. Weiterhin werden über Nacht die Bakterienzellen bei 30°C als 1l-Vorkultur angezogen. Dem sterilen Wasser werden nach der Abkühlung auf Raumtemperatur 1l 10fach LB-Medium, 3 ml Entschäumer (Extran 31, Merck), 1g Ampicillin, 0,3g Chloramphenicol sowie die Vorkultur zugefügt. Die Anzucht der Zellen erfolgt bei 30°C, unter pH-Wert-Kontrolle (pH 7,5), bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 2. Sobald die gewünschte Zelldichte erreicht ist, werden 500ml sterile Glucoselösung (100g/500ml) und 500ml Caseinhydrolysatlösung (100g/500ml) zugesetzt und die Temperatur zur Induktion auf 42°C erhöht. Nach zweistündiger Expression werden die Zellen abzentrifugiert (5000rpm, 10min).

Die Zellen werden anschließend in 100ml PDL / 0,5M NaCl resuspendiert und weiter aufgearbeitet oder eingeforen (-20°C).

PDL:	30mM	KP _i , pH 7,2
	0,1mM	DTT
	0,01% (v/v)	Lubrol

2.3.3 Zellaufschluß

Der Aufschluß der fermentierten Zellen erfolgt durch Ultraschall. Die Zellen werden in einem Becherglas auf Eis gekühlt und fünfzehnmal 60s (*Duty cycle*: 60%, *Output control*: Stufe 6) mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250, Ultrasonics)

beschallt. Jeweils nach einer Minute Beschallung wird für eine Minute pausiert und gekühlt. Zur Gewinnung des klaren Zellysates wird anschließend 1h zentrifugiert (100000g, 4°C).

2.3.4 Chromatographische Verfahren

2.3.4.1 Affinitätschromatographie

Der erste Schritt der Aufreinigung der *EcoRI*-Mutanten aus dem klaren Zellysat ist die Bindung der Proteine an Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen). Alle in dieser Arbeit erzeugten *EcoRI*-Mutanten haben am C-Terminus sechs Histidinreste fusioniert, über welche Koordinationsplätze der Ni²⁺-Ionen aus der Gelmatrix besetzt werden können und somit eine schnelle und effiziente Proteinaufreinigung erreicht wird. Die funktionellen Gruppen des Gelmaterials sind Ni²⁺-Ionen, die durch Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert und an eine Agarosematrix gebunden sind [Hochuli, 1990]. Von den insgesamt sechs Koordinationsstellen des Ni²⁺-Kations können zwei von den Histidinresten belegt werden und fungieren unter geeigneten Pufferbedingungen als Liganden, die das Protein sehr effektiv binden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt über einen Puffer der Imidazol enthält, welches um die Bindungsplätze kompetiert. Da die Bindung von Proteinen an Ni²⁺-NTA-Agarose nicht durch hohe Ionenstärken beeinflusst wird, können durch das Einstellen hoher Ionenstärken in diesem Schritt bereits DNA-Verunreinigungen entfernt werden.

Für die Aufarbeitung eines 10l-Fermenters wird 1ml Ni²⁺-NTA-Agarose mit 100ml PDL-Puffer, 0,5M NaCl, 10mM Imidazol äquilibriert. Das klare Zellysat wird zur Senkung der Viskosität 1:5 mit Äquilibrierungspuffer verdünnt. Der pH-Wert der Lösung wird mit Ammoniaklösung auf 7,5 eingestellt. Nach dem Auftrag auf das Säulenmaterial wird die Säule mit 100ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Imidazolgradienten von 10–200mM Imidazol (in PDL-Puffer/0,5M NaCl) in einem Gesamtvolumen von 400ml. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 10ml aufgefangen, die mittels TCA-Fällung von je 100µl der Fraktionen und SDS-PAAGE (2.3.5) auf ihren Gehalt an *EcoRI* untersucht werden. Die Fraktionen mit hohem *EcoRI*-Gehalt werden vereinigt.

2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Für eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung der in der Affinitätschromatographie vereinten Proteinfractionen wird eine Ionenaustauschchromatographie mit Phosphocellulose (P-Cell, Whatman) angeschlossen. *EcoRI* geht als DNA-bindendes Protein wesentlich stärkere Bindungen mit den Phosphatgruppen des Trägermaterials ein als andere Proteine. DNA-Verunreinigungen binden aufgrund ihrer negativen Ladung nicht an die Phosphocellulose, so daß eine quantitative Abtrennung möglich ist.

Ein Säulenvolumen von 5ml Phosphocellulose wird mit 100ml PEDL/0,1M NaCl pH 7,2 äquibriert. Die vereinigten Proteinfractionen werden mit PEDL-Puffer 1:5 verdünnt, um die NaCl-Konzentration auf 0,1M zu senken. Die Ionenkonzentration auf der Säule und in der Auftragslösung wird über eine Leitfähigkeitsmessung verglichen und auf ungefähr gleiches Niveau eingestellt. Nach dem Auftrag wird die Säule mit 100ml Äquibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem Stufengradienten mit je 5ml PEDL/0,33M; 0,66M; 1M; 1,33M; 1,66M und 2M NaCl, wobei die Eluate 1x rezykliert werden.

PEDL:	30mM	KP _i , pH 7,2
	0,1mM	DTT
	0,01% (v/v)	Lubrol
	0,5mM	EDTA

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen anhand der Molekülmasse. Die Proteine werden im Verlauf der Denaturierung mit dem Detergens SDS beladen. Daraus resultiert eine Gesamtladung des Komplexes, die etwa proportional der Molekülmasse des Proteins ist. Die Eigenladung des Proteins wird durch den hohen Überschuß an SDS überdeckt, so daß durch gleiches Masse/Ladungs-Verhältnis eine elektrophoretische Auftrennung nach Molekülmasse möglich ist [Laemmli, 1970].

Zur Auftrennung der Proteinproben wird ein diskontinuierliches, denaturierendes Polyacrylamidgel gegossen, welches aus einem weitmaschigen Sammelgel (6%ig) und einem engermaschigen Trenngel (17,5%ig) besteht. Durch das Sammelgel wird die Proteinprobe am Anfang der Elektrophorese konzentriert. Als Proteinstandard wird *wtEcoRI* auf das Gel aufgetragen.

Laemmli-Gel:

Für ein Laemmligel der Größe 7 x 10 x 0,1cm werden etwa 10ml 17,5%ige Trenngellösung benötigt. Zu der Lösung werden je 20µl TEMED und 40%ige APS zugefügt, die Lösung in die Gelkammer gegossen, mit Ethanol überschichtet und für 15-30min auspolymersiert.

17,5%iges Trenngel:

58ml	30%ige Acrylamidlösung (AA), 0,8% BisAA
28ml	1,5M Tris/HCl, pH8,8
10ml	1% SDS
4ml	ddH ₂ O

Danach wird das Ethanol abgegossen, 1,5ml Sammelgellösung mit je 10µl TEMED und 40%igem APS versetzt, auf das auspolymersierte Trenngel gegossen, der Taschenkamm eingeführt und zum Auspolymersieren des Sammelgels erneut 15-30min gewartet.

6%iges Sammelgel:

20ml	30%ige Acrylamidlösung (AA), 0,8% BisAA
12,5ml	1M Tris/HCl, pH6,8
10ml	1% SDS (w/v)
47,5ml	ddH ₂ O

Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird die Gelkammer mit Elektrodenpuffer gefüllt.

Laemmli-Elektrodenpuffer (10fach):

0,25M	Tris
1%	SDS
1,9M	Glycin

Nach Beladen des Gels wird die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke (30mA) solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Gel verläßt (ca. 1,5-2h).

Der Proteinnachweis erfolgt durch Anfärbung des Gels in einer Coomassie Brilliant Blue R 250 und 250G-Lösung.

Dazu wird das Gel in der Färbelösung einmal aufgeköcht und anschließend durch kochen in 7%iger Essigsäure entfärbt, bis der proteinfreie Hintergrund farblos erscheint. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei 10ng.

Laemmli-Färbelösung:

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

2.3.6 Dialyse

Die Dialyse der aufgereinigten Proteine dient zum einen der Konzentrierung (ca. 5 fach), zum anderen werden sie für eine dauerhafte Aufbewahrung stabilisiert. Dafür wird das Eluat über Nacht gegen 500ml PDL-Puffer / 0,3M NaCl / 70% Glycerin dialysiert (Dialyseschläuche: VIS-KING, molekulare Ausschlußgrenze 12-14kDa). Die Proteinkonzentration der dialysierten Proteine wird durch UV-Spektroskopie (2.3.7) ermittelt. Die Reinheit des Proteins wird mittels SDS-PAAGE überprüft. Die Lagerung des Proteins erfolgt bei -20°C .

2.3.7 UV-Spektroskopie

Für die Konzentrationsbestimmung der dialysierten *EcoRI*-Proteine wird ein Spektrum im Bereich 220-320nm aufgenommen (Spektralphotometer Hitachi U-3210). Die Messung erfolgt bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1cm). Die Konzentration wird nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{278}=52985 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das Wildtyp-Enzym bestimmt [Modrich&Zabel, 1976].

2.4 Biochemische Charakterisierung der *EcoRI*-Mutanten

2.4.1 λ -DNA-Kinetiken

Als Standardtest für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der *EcoRI*-Mutanten hat sich die Spaltung des makromolekularen Substrates λ -DNA (48502Bp) etabliert. Die Angabe der spezifischen Aktivität erfolgt in U/mg (1U ist die Menge Protein (*EcoRI*), mit der 1 μg λ -DNA unter Standardpufferbedingungen bei 37°C innerhalb einer Stunde gespalten wird). Bei der Verwendung von *EcoRI*-Standardpuffer werden normalerweise nur die 5 kanonischen Spaltstellen auf λ -DNA gespalten (Abb. 11). Die spezifische Aktivität wird anhand des Zeitwertes berechnet, zu dem das vollständige Spaltmuster entstanden ist. Die Kinetik der Spaltung von *EcoRI*-Mutanten im Vergleich zum *EcoRI*-Wildtypenzym liefert Rückschlüsse auf Aktivität und Spezifität der Mutanten. Das wt-Enzym spaltet unter relaxierten Bedingungen unter Verwendung von Mn^{2+} -Starpuffer, sowie auch pH 8,8-Starpuffer neben den kanonischen Spaltstellen auch Starspaltstellen, die um ein Basenpaar von der kognaten Sequenz abweichen.

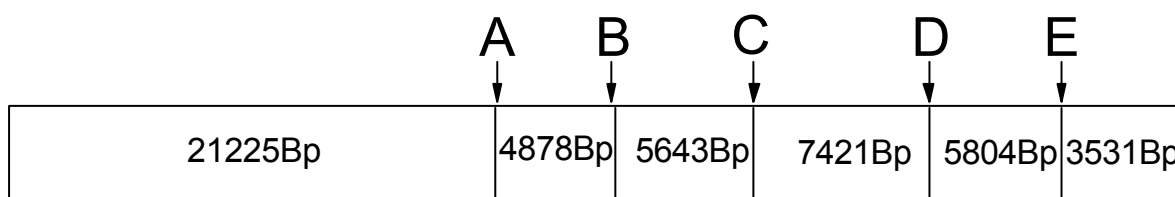


Abb. 11: Spaltstellen von *EcoRI* auf λ -DNA mit Angabe der Länge der Spaltfragmente.

Spaltpufferbedingungen:

*Eco*RI-Standardpuffer 20mM Tris/HCl pH 7,5
 10mM MgCl₂
 50mM NaCl

Mn²⁺-Starpuffer 20mM Tris/HCl pH 7,5
 1mM MnCl₂
 50M NaCl

pH 8,8-Starpuffer 20mM Tris/HCl pH 8,8
 1mM MgCl₂
 5mM NaCl

2.4.2 pUC8-Kinetiken

Eine weiteres Substrat für die quantitative Bestimmung der Aktivität von *Eco*RI-Mutanten ist das Plasmid pUC8. Das 2665Bp große Plasmid besitzt eine nur *Eco*RI-Spaltstelle und eignet sich besser als λ -DNA für die Aktivitätsbestimmung von nicht so aktiven Mutanten. Bei der Spaltung von pUC8 wird das Plasmid durch einen Schnitt in einem Strang („Nick“) in die offen zirkuläre Form gebracht und durch den anschließenden zweiten Schnitt im Gegenstrang in die linearisierte Form überführt, wobei beide Spaltungen in der Gelelektrophorese verfolgbar sind

2.4.3 Kinetiken mit modifizierten Oligonukleotiden

Im Kontext der Untersuchung von Phosphatkontakten während der DNA-Erkennung von *Eco*RI wurden mit dem Wildtypenzym und den K117-Mutanten Kinetiken mit modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt. Bei den Oligonukleotiden handelt es sich um selbstkomplementäre Dodekamere. An jeweils einer Position innerhalb oder direkt neben der Erkennungssequenz ist jeweils ein Methylphosphonat in R oder S-Konfiguration eingebaut. Die Synthese der Oligonukleotide (Tab. 4) erfolgte im Labor von Dr. S.B. Katti (Central Drug Research Institute, Lucknow, India).

Name	Basensequenz
CTRL	GACGAATTCGTC
CG1-R	GAC↓GAATTCGTC
CG1-S	GAC↓GAATTCGTC
GA-R	GACG↓AATTCGTC
GA-S	GACG↓AATTCGTC
AA-R	GACGA↓ATTCGTC
AA-S	GACGA↓ATTCGTC
AT-R	GACGAA↓TTCGTC
AT-S	GACGAA↓TTCGTC
TT-R	GACGAAT↓TCGTC
TT-S	GACGAAT↓TCGTC
TC-R	GACGAATT↓CGTC
TC-S	GACGAATT↓CGTC
CG2-R	GACGAATTC↓GTC
CG2-S	GACGAATTC↓GTC

Tab. 4: Sequenzen der dodekameren Methylphosphonate (↓ Position der Methylphosphonatmodifikation).

Zur Detektion der Oligonukleotide werden diese mit terminaler Transferase (2.4.4.1) über eine 3'-Phosphorylierung mit $^{32}\text{P}[\alpha\text{ddATP}]$ radioaktiv markiert. Mit den modifizierten Oligonukleotiden werden unter Standardpufferbedingungen, mit jeweils $1\mu\text{M}$ Oligonukleotid und 100nM Enzym (10facher Substratüberschuß) im Ansatz, Spaltkinetiken durchgeführt. Aus der Spaltkinetik wird über die Umsatzgeschwindigkeit am Anfang der Spaltung die Geschwindigkeitskonstante K_{app} bestimmt.

Die Trennung von Substrat und Produkt im Anschluß an die Spaltung erfolgt durch eine Gelelektrophorese in einem denaturierendem 18%igen Polyacrylamidgel (6M Harnstoff). Die anschließende Quantifizierung der Kinetik erfolgt mit dem Phosphoimager BAS 1000 bio imager der Firma Fuji.

2.4.3.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Markierungsansatz der 3'-Phosphorylierung

10µl	Oligonukleotid (50µM)
4µl	5 x Terminale Transferase-Puffer
1µl	³² P[αddATP] (10µCi/µl, Amersham)
1µl	Terminale Transferase (5U/µl, Fermentas)
4µl	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für ca. 5h inkubiert. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der Oligonukleotide mit dem *Nukleotide Removal Kit* der Firma Qiagen.

2.4.4 Gelretardationsexperimente (*Mobility-Shift-Assays*)

Diese Methode dient zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K_{ass} von *EcoRI*-Mutanten. Die Grundlage der Methode ist die veränderte Laufeigenschaft des Protein-DNA-Komplexes im Vergleich zu dem freien markierten DNA-Fragment in einem nativen Gel. Obwohl die Lebensdauer des Protein-DNA-Komplexes in Lösung wesentlich kürzer ist als die Gellaufzeit, läßt sich der Laufunterschied in einem 6%igen Polyacrylamidgel mit 20cm Laufstrecke detektieren. Als *Shift*substrat dient ein 174Bp langes PCR-Produkt (Tab. 5) mit einer in der Mitte gelegenen *EcoRI*-Erkennungssequenz. Das PCR-Produkt wird durch Zugabe von ³²P[αdATP] in den PCR-Ansatz radioaktiv markiert. Als *Template* für die Reaktion dient pBR322.

PCR-Ansatz:

10µl	10 x <i>Pfu</i> Polymerase-Puffer
10µl	2mM dNTP-Lösung
2µl	<i>Primer</i> Shiftin
2µl	<i>Primer</i> Shiftther
1µl	pBR322 (linearisiert; 100ng)
1µl	³² P[αdATP] (10µCi/µl, Amersham)
1µl	<i>Pfu</i> -Polymerase

ad 100µl dd H₂O

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

Tab. 5a: Sequenz der PCR-Primer zur Erzeugung des 174er *Shift*-Substrates

	Temperatur [C°]	Wechselzeit [C°/s]	Reaktionszeit [s]
Denaturierung 1x	91	3	300
Amplifikation 30 x	63	3	90
	72	3	60
	92	3	60
finale Extension 1 x	63	3	90
	72	3	400

Tab. 5b: PCR-Programm für die Herstellung des *Shift*substrates

Im Anschluß an die PCR wird das *Shift*substrat über den *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt.

2.4.4.1 Bindungsansätze

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wird eine feste *Shift*substratkonzentration von 1nM mit verschiedenen Enzymkonzentrationen im Bereich 0,1nM bis 20nM in 20mM Tris/HCl, pH 7,5 / 50 mM NaCl / 25mM EDTA für 30min bei RT inkubiert. Die Ansätze werden anschließend direkt auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen.

6%ige Gellösung:

10ml	30% Acrylamid (w/v)/Bisacrylamid (w/v) (37,5:1; AGS)
0,25ml	20 x TTE
39,75ml	ddH ₂ O

Die Polymersiastion des Gels wird durch Zugabe von 80µl TEMED und 80µl 40%igem (w/v) APS gestartet.

Laufpuffer: 0,5 x TTE

20 x TTE:

1,8M	Tris
0,6M	Taurin
12mM	EDTA

Die Proben werden vor dem Auftrag auf das Gel mit Glycerin (10%) beschwert und ohne sonstige Zusätze, die nach Zhang *et al.* (1993) die Bindungsdaten beeinflussen können, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150V für 3h bei RT, bis der als Frontmarker aufgetragene Azorubinpuffer das Gelende erreicht.

Das Gel wird im Vakuum getrocknet und anschließend für ca. 2h auf eine Phosphoimagerplatte aufgelegt. Die Phosphoimagerplatte wird anschließend in einem Gerät der Firma Fuji (BAS 1000 bio imager) ausgewertet und mit dem Programm MacBAS2.0 quantifiziert. Aus der erhaltenen Bindungskurve wird die Gleichgewichtskonstante mit der folgenden Formel bestimmt.

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

F = Anteil der gebundenen DNA

E₀ = Gesamtkonzentration Enzym

O₀ = Gesamtkonzentration Oligonukleotid

2.4.4.2 Ca²⁺-Mobility-Shift-Assay

Für *EcoRI*-Mutanten, die nur in Anwesenheit zweiwertiger Kationen DNA binden, wie die Mutanten K130E, sowie die unter 3.1.1 beschriebenen Mutanten, werden in Anlehnung an *EcoRV*-Bindungsexperimente [Vipond & Halford, 1995], Ca²⁺-Bindungsansätze verwendet. Dazu werden dem Gelsystem und dem Bindungspuffer 1mM CaCl₂ zugesetzt und auf das EDTA im Puffer verzichtet. Der pH-Wert des Puffers und der Gellösung wird auf 7,5 eingestellt und die Gellösung vor dem Gießen im Vakuum entgast. Der Vorlauf des Gels wird 2h bei 200V durchgeführt und

anschließend der Puffer im oberen Puffertank erneuert. Der Hauptlauf findet bei 200V für 3h statt, bis der Frontmarker Azorubinrot das Gelende erreicht hat. Anschließend wird das Gel getrocknet und ausgewertet (2.5.1).

2.4.4.3 Mobility-Shift Assay mit modifizierten Oligonukleotiden

Für die Bestimmung der spezifischen Bindung von *EcoRI*-Mutanten an die unter 2.4.3. beschriebenen Methylphosphonate wird aufgrund der geringen Substratgröße ein TBE-Gelsystem verwendet. Zu einer festen Oligonukleotidkonzentration von 100nM werden im Bindungsansatz Enzymkonzentrationen im Bereich 10nM bis 1 μ M zugefügt und in 20mM Tris/HCl, pH 7,5 / 50 mM NaCl / 25mM EDTA bei RT für 30min inkubiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 100V in 0,5 x TBE-Puffer für 3-4h. Die Gelbehandlung und Auswertung wird gemäß 2.4.4. durchgeführt.

10 x TBE-Puffer

1M	Tris pH 8,3
1M	Borsäure
25mM	EDTA

2.4.4.4 CD-Spektroskopie

Zur Überprüfung, ob die *EcoRI*-Mutanten mit dem *EcoRI*-Wildtypenzym vergleichbare Sekundärstrukturanteile enthalten, werden Circular dichroismus-Experimente (CD) in einem Jobin Yvon Dichrograph R.J Mark III in 0,05cm Küvetten bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu werden Spektren im Wellenlängenbereich 190 bis 250nm aufgenommen. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm CIRC 42 (Peters & Greipel, 1993), das unter Zuhilfenahme von Standardspektren den prozentualen Anteil an α -Helix und β -Faltblatt ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für Spezifität und katalytische Aktivität von *EcoRI*

3.1.1 Untersuchung einer postulierten Metallionen-Bindungsstelle in unmittelbarer Umgebung der *Inner arm*-Region der Mutante K130E

Die Mutante K130E wurde bereits im Zuge der Untersuchung der funktionellen Bedeutung der *Inner arm*-Region für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* von Frau Dr. Stefanie Windolph hergestellt [Windolph *et al.*, 1997b]. Mit *Inner arm*-Region werden die *Loops* bezeichnet mit welchen die beiden Enzymuntereinheiten die DNA vollständig umgreifen (Abb. 12). An der Spitze der *Inner arm*-Region sind die Aminosäuren Lys130 und Arg131 lokalisiert.

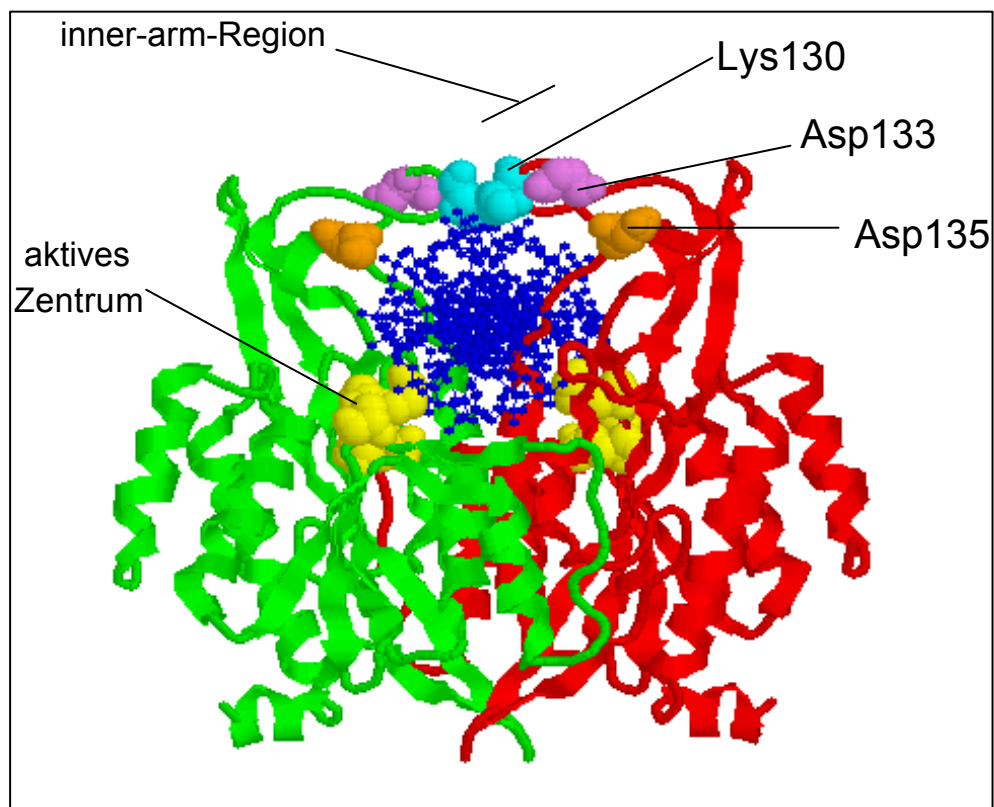


Abb. 12: *EcoRI*-Dimer im Komplex mit seiner spezifischen Erkennungssequenz. Speziell hervorgehoben sind die Aminosäuren Lys130, Asp133 und Asp135 der *Inner arm*-Region.

Lys130 ist laut Kristall-Struktur in der Lage, einen Kontakt zu dem Phosphat in 3'-Richtung vom Cytosin der Erkennungssequenz zu bilden [Rosenberg, 1991]. Für die

Aminosäure Arg131 besteht die Möglichkeit, diesen potentiellen Phosphatkontakt durch die zusätzliche positive Ladung zu unterstützen. Die Mutante K130E zeigte folgende Charakteristika [Windolph *et al.*, 1997b]:

- Die Spaltaktivität war gegenüber dem Wildtypenzym um den Faktor 200 reduziert. Weiterhin war das Spaltmuster verändert, da die λ -B-Spaltstelle langsamer gespalten wurde, als die anderen vier Spaltstellen auf λ -DNA. Durch die Zugabe von geringen Mengen Ca^{2+} -Ionen (0,2mM) wurde die Mg^{2+} -abhängige Spaltung um den Faktor 10 stimuliert.
- Die Mutante K130E zeigte keinerlei Starspaltaktivität und spaltete unter Starbedingungen alle fünf Spaltstellen auf λ -DNA mit gleicher Rate.
- Im Bindungsassay (2.4.4.) wurde in Abwesenheit von dem Kofaktor Mg^{2+} keine spezifische Bindung detektiert. Durch Zugabe von 1mM Ca^{2+} wurde jedoch das Vermögen zur spezifischen Bindung wieder hergestellt.

Aus dem Bindungsverhalten wurde gefolgert, daß die Mutante K130E divalente Kationen, die außerhalb des katalytischen Zentrums an einer weiteren Kationenbindungsstelle binden, für DNA-Bindungs- und Spaltaktivität benötigt. Dies wurde insbesondere durch die Tatsache belegt, daß die Mg^{2+} -abhängige Spaltaktivität durch Ca^{2+} -Ionen in geringer Konzentration stimulierbar war.

Ein denkbarer Ausgleich für den Verlust einer positiven Ladung an der Spitze der *Inner arm*-Region durch Positionierung eines zweiten Kations mit Hilfe des Glutamatrestes der Mutante K130E ist auszuschließen, da die Mutante K130A ebenfalls nur in Gegenwart von Ca^{2+} DNA gebunden hat [Windolph *et al.*, 1997b]. Da der Verlust der positiven Ladung in der Nähe der Position 130 kompensiert werden sollte, müßte die Bindungsstelle für ein zweites Kation nahe zu dieser Position liegen. Der beste Kandidat für eine solche Metallionen-Bindungsstelle ist das Asp-Xaa-Asp-Motiv an der Position 133 bis 135, daß eine typische Ca^{2+} -Bindungsstelle in Oligopeptiden darstellt [Schneider-Mergener *et al.*, 1996]. Um diese potentielle Bindungsstelle zu untersuchen, wurde eine möglicherweise bestehende Kationenbindung an die Positionen 133 und 135 durch zielgerichtete Mutagenese ausgeschaltet. Dazu wurden die Mutanten K130E/D133A, K130E/D135A und K130E/D133A/D135A hergestellt und auf ihre DNA-Bindungsfähigkeit und katalytische Aktivität untersucht. Als Ergebnis sollte im Falle, daß eine Metallionen-Bindungsstelle an dieser Position vorliegt, eine deutliche Abnahme der Spaltaktivität

oder sogar eine Inaktivierung, sowie eine deutliche Abnahme der DNA-Bindungs-fähigkeit oder auch Bindungsinaktivität im Vergleich zu K130E nachzuweisen sein.

3.1.1.1 Zielgerichtete Mutagenese

Die Mutanten K130E/D133A, K130E/D135A und K130E/D133A/D135A wurden nach der unter 2.2.1.1 beschriebenen *Gapped-duplex*-Methode hergestellt. Als doppelsträngiges Vektorfragment (Rahmen) wurde mit *HindIII* und *SpeI* gespaltenes pRIF309+(His₆) verwendet. Mit dem aus der *Gapped-duplex*-Mutagenese erhaltenen heterogenen Plasmid wurde der reparaturdefiziente Stamm WK6mutS(λ) (2.1.1) transformiert (2.1.4). Zur Anreicherung der markerpositiven Plasmide wurde die gewonnene Plasmid-DNA mit *PvuII* gespalten, das lineare Plasmid isoliert und religiert. Mit diesem wurden anschließend LK111(λ) (2.2.1) transformiert und jeweils einige Einzelklone zur Bestätigung des Mutageneseerfolges sequenziert (2.2.3). Um Sekundärmutationen auszuschließen, wurde nicht nur die mutierte Stelle, sondern das gesamte Gen sequenziert. Die Plasmide mit erfolgreich verändertem *ecoRI*-Gen wurden anschließend für die Expression der Enzyme in TGE900(pEcoR4)-Zellen (2.1.1) transformiert. Die Proteinexpression wurde zunächst in einem Expressionstest (2.3.1) überprüft und nachfolgend eine Fermentation (2.3.2) der jeweiligen *EcoRI*-Mutante im 10l-Maßstab durchgeführt. Zur Aufreinigung wurden die Bakterienzellen im Ultraschallbad aufgeschlossen (2.3.3), und über eine Affinitätschromatographie (2.3.4.1) und anschließende Ionenaustauschchromatographie (2.3.4.2) die mutierten Proteine aus dem Zelllysät aufgearbeitet. Die Überprüfung der Reinheit der Proteinpräparationen erfolgte in einem Laemmliigel (2.3.5). Die Reinheit aller aufgereinigten Proteine war im Durchschnitt größer als 95%.

3.1.1.2 CD-Daten der *Inner arm*-Mutanten

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurden von den aufgereinigten *EcoRI*-Mutanten CD-Spektren (2.4.4.4) im Bereich 190-250nm aufgenommen (Tab. 6).

Enzym	Konzentration [μM]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
wt <i>EcoRI</i>	4,4	39	16
K130E	1,0	38	21
K130E/D133A	3,0	36	18
K130E/D135A	1,0	26	11
K130E/D133A/D135A	0,7	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Tab. 6: Sekundärstrukturanteile des Wildtypenzym und der Mutanten der *Inner arm*-Region.

Von der Mutante K130E/D133A/D135A konnte aufgrund der geringen erreichten Konzentration (0,8 μM) kein auswertbares CD-Spektrum aufgenommen werden. Mit Ausnahme der Mutante K130E/D135A entsprechen alle Mutanten im Rahmen der Meßgenauigkeit dem *EcoRI*-Wildtypenzym.

3.1.1.3 Spaltverhalten der *EcoRI*-Mutanten der *Inner arm*-Region

Die Spaltaktivitäten von K130E, K130E/D133A, K130E/D135A und K130E/D133A/D135A wurden zunächst mit λ -DNA als Substrat getestet (2.4.1). Da es sich bei den Mehrfachmutanten um relativ inaktive Enzyme handelt, wurde in diesem Assay keine vollständige Spaltung von allen fünf *EcoRI*-Spaltstellen mit λ -DNA als Substrat erreicht, womit eine Berechnung der spezifischen Aktivität nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden weitere Spaltkinetiken mit pUC8 als Substrat (2.4.2) durchgeführt und die spezifischen Spaltaktivitäten für dieses Substrat berechnet.

In Abbildung 13 wird die pUC8-Kinetik der Mutante K130E beispielhaft gezeigt.

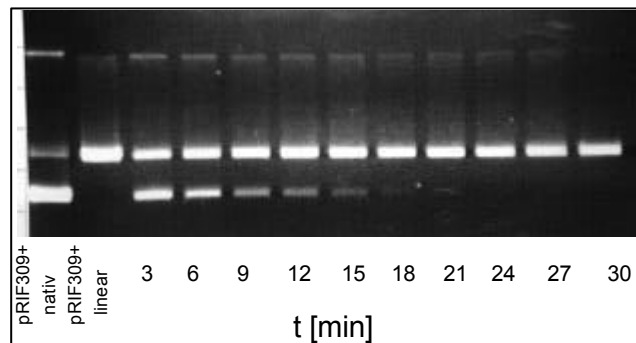


Abb. 13: Kinetik der Mutante K130E mit pUC8 als Substrat.

Die Ergebnisse der spezifischen Spaltungen von pUC8 für die verschiedenen Mutanten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die spezifische Aktivität von 1U entspricht der Spaltung von 1µg pUC8 pro Stunde (U/mg), bei 37°C. Die Mutante K130E hat mit λ-DNA als Substrat eine spezifische Aktivität von 2×10^5 U/mg für die λ-A,C,D,E-Spaltstelle und 3×10^4 U/mg für die λ-B-Spaltstelle. Somit zeigt das Enzym auf pUC8-Substrat eine größere Aktivität.

Enzym	Spez. Aktivität [U^{pUC8}/mg]
K130E	$8,0 \times 10^5$
K130E/D133A	$2,4 \times 10^4$
K130E/D135A	$2,0 \times 10^3$
K130E/D133A/D135A	$1,5 \times 10^3$

Tab. 7: Spezifische Aktivität der *EcoRI*-Mutanten der *Inner arm*-Region mit pUC8-Substrat.

Im Vergleich zu K130E nimmt bei der Mutante K130E/D133A die spezifische Aktivität um den Faktor 30 und bei den Mutanten K130E/D135A und K130E/D133A/D135A um den Faktor 500 ab.

3.1.1.4 Bindungsverhalten der *EcoRI*-Mutanten der *Inner arm*-Region

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K_{ass} der vier *EcoRI*-Mutanten wurden Gelretardationsexperimente (2.4.4) durchgeführt. Zu Beginn wurde der unter 2.4.4.1 beschriebene Ansatz ohne zweiwertige Kationen verwendet. Für alle Mutanten konnte nachgewiesen werden, daß sie in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen keine DNA binden (Ergebnis nicht dargestellt). Ausgehend von der Eigenschaft der Mutante K130E (3.1.1), welche in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen keine DNA zu binden vermag, wurde dieses Ergebnis auch für die anderen Mutanten erwartet. Nachfolgend wurde daher die Bindungskonstante für alle Mutanten mit Ca^{2+} -Ionen im Bindungsansatz (2.5.2) bestimmt. Ca^{2+} ist als zweiwertiges Kation für Bindungstests geeignet, da es wie im Fall der Mutante K130E bereits gezeigt, die Bindungsfähigkeit wieder herstellt, aber nicht zur DNA-Spaltung beiträgt. Das *Shift*experiment ist für die verschiedenen Mutanten in Abbildung 14 dargestellt.

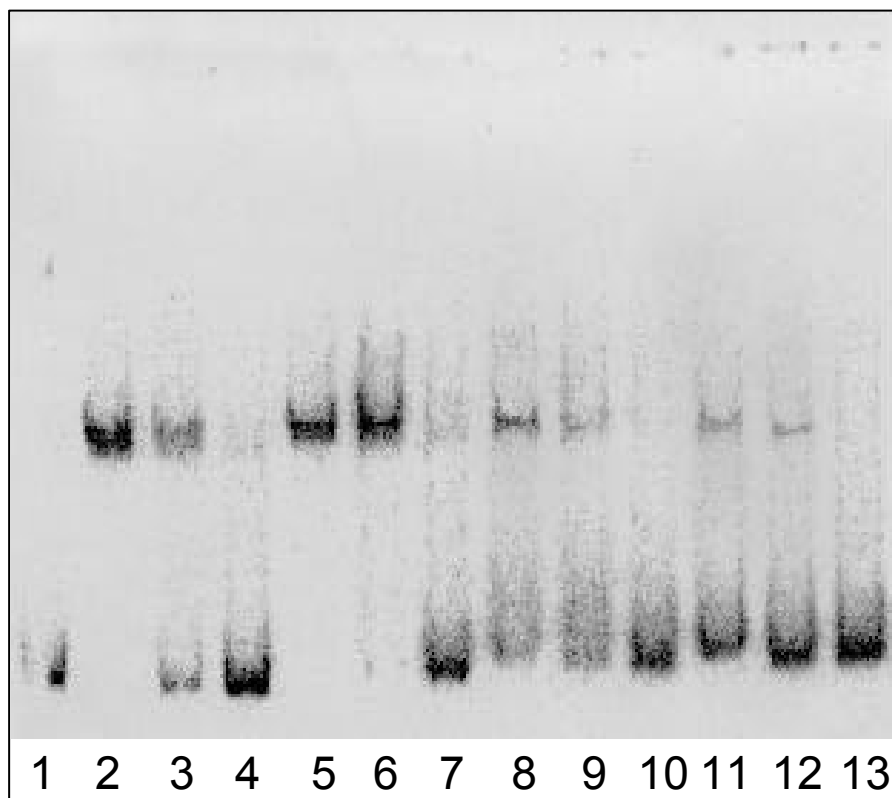


Abb. 14: Bindungs-Experimente der Mutanten K130E (Reihe 2, 3, 4), K130E/D133A (Reihe 5, 6, 7), K130E/D135A (Reihe 8, 9, 10) und K130E/D133A/D135A (Reihe 11, 12, 13). Referenz ist eine 0,5nM Lösung des 174bp langen *Shift*substrats (Reihe 1). Die Enzymkonzentrationen betragen von links nach rechts je 2,5nM, 0,5nM und 0,05nM.

Die berechneten Bindungskonstanten (2.4.4) sind in der Tabelle 8 aufgeführt.

Enzym	$K_{\text{ass}}[\text{M}^{-1}]$
K130E	$2,0 \times 10^9$
K130E/D133A	$8,0 \times 10^9$
K130E/D135A	$5,0 \times 10^8$
K130E/D133A/D135A	$2,0 \times 10^8$

Tab. 8: Bindungskonstanten der *Inner arm*-Region Mutanten im *Shift*experiment mit Ca^{2+} .

Verglichen mit K130E, hat die Mutante K130E/D133A eine vielfach größere Bindungskonstante, wogegen die spezifische Aktivität dieser Mutante um den Faktor 30 geringer ist (3.1.4). Die Mutanten K130E/D135A und K130E/D133A/D135A weisen eine um etwa den Faktor 5 - 10 geringere Bindungskonstante als K130E auf, wogegen die spezifische Aktivität der beiden Mutanten um den Faktor 500 erniedrigt ist.

3.1.2 Nachweis eines Phosphatkontaktes an der Position Lys117

Die Aminosäure Lys117 befindet sich in geeigneter Position einen Kontakt zum Phosphat zwischen dem Adenin und dem Thymin der *EcoRI*-Erkennungssequenz auszubilden. Auch wenn dieser Aminosäurerest anhand der Strukturdaten von der DNA weggerichtet ist und in Richtung Asn121 zeigt (Abb. 15), besteht die Möglichkeit einer Wechselwirkung, da Ladungen durch den Raum wirken.

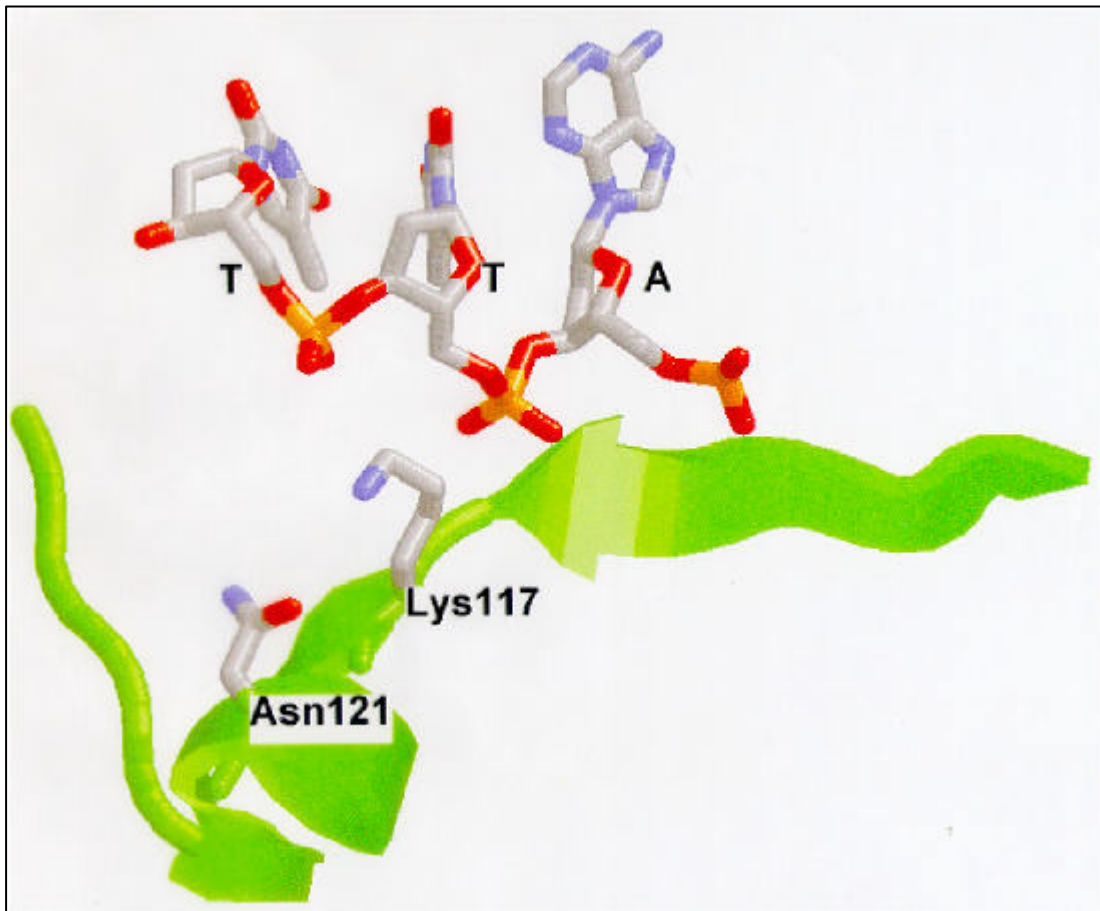


Abb. 15: Position der Aminosäure Lys117 im Kontext der Erkennungssequenz.

Um den möglichen Einfluß dieses postulierten Phosphatkontaktes zu untersuchen, wurde durch zielgerichtete Mutagenese (2.2.1.2) die basische Aminosäure Lysin gegen die neutrale Aminosäure Alanin, gegen die zu hydrophoben Wechselwirkungen fähige Aminosäure Leucin und gegen die saure Aminosäure Glutamat ausgetauscht. Die Mutanten wurden anschließend auf Spalt- und Bindungsaktivität untersucht.

Ausgehend von dem daraus resultierenden Verhalten der Mutante K117E, die trotz der Einführung einer negativen Ladung in unmittelbarer Nähe zur DNA, fast Wildtyp-

Spalt- und Bindungsaktivität aufweist, wurden zwei weitere Mutanten generiert. In diesen Mutanten wurden die sauren Aminosäure Aspartat und das isosterische Säureamid Glutamin an der Position 117 eingebaut.

3.1.2.1 Gezielte Mutagenese und Proteinexpression der K117-Mutanten

Die Mutanten K117A, K117D, K117E, K117L und K117Q wurden mit dem Verfahren der PCR-Mutagenese (2.2.1.2) hergestellt. Als *Template* für die erste PCR wurde pRIF309+(His₆) verwendet. Der so erzeugte *Megaprimer*, welcher jeweils die Mutation beinhaltet, wurde mit pRIF309+ ohne His₆ als *Template*, in der zweiten PCR zur Amplifikation des gesamten *ecoRI*-Gens eingesetzt. Das mutierte Gen wurde anschließend über die Restriktionsspaltstellen für *HindIII* und *SpeI* in einen entsprechend präparierten pRIF309+(His₆)-Rahmen kloniert. Nach Transformation (2.1.4) von LK111(λ)-Zellen (2.1.1) wurde von einigen ausgewählten Klonen die Plasmid-DNA präpariert und mit dem jeweiligen *Screening*-Enzym gespalten. Spaltpositive Plasmid-DNA wurde sequenziert (2.2.3.4) und mit sequenzpositiven Plasmiden TGE900(pEcoR4)-Zellen transformiert. Anschließend wurde ein Expressionstest (2.3.1) durchgeführt und die proteinexprimierenden Zellen nachfolgend im 10l-Maßstab fermentiert (2.3.2). Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen (2.3.3) und die mutierten Enzyme nach den unter 2.3.4 beschriebenen chromatographischen Verfahren aufgereinigt und stabilisiert (2.3.6).

3.1.2.2 CD-Daten der K117-Mutanten

Wie unter 2.6 beschrieben, wurden die Sekundärstrukturanteile der Mutanten bestimmt und mit dem Wildtypenzym verglichen (Tab. 9).

Enzym	Konzentration [μM]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
wtEcoRI	4,4	39	16
K117A	2,0	35	17
K117D	28	32	14
K117E	1,3	29	21
K117L	7,8	34	16
K117Q	7,1	38	17

Tab. 9: Sekundärstrukturanteile der K117-Mutanten.

Alle K117-Mutanten zeigen im Rahmen der Meßgenauigkeit mit dem Wildtypenzym vergleichbare Sekundärstrukturanteile. Eine Ausnahme bildet die Mutante K117E, die möglicherweise aufgrund ihrer zu niedrigen Konzentration zu niedrige α -Helix-Anteile aufzeigt.

3.1.2.3 Spaltverhalten der K117-Mutanten

Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten wurde durch Spaltkinetiken (2.4.1) mit dem Substrat λ -DNA bestimmt (Tab. 10).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]
wt <i>EcoRI</i>	$1,7 \times 10^6$
K117A	$3,0 \times 10^2$
K117D	$5,0 \times 10^2$
K117E	$1,5 \times 10^5$
K117L	$4,1 \times 10^2$
K117Q	$1,6 \times 10^5$

Tab. 10: Spezifische Aktivitäten der K117-Mutanten.

In Abbildung 16 ist exemplarisch die Kinetik von K117E mit dem Substrat λ -DNA dargestellt.

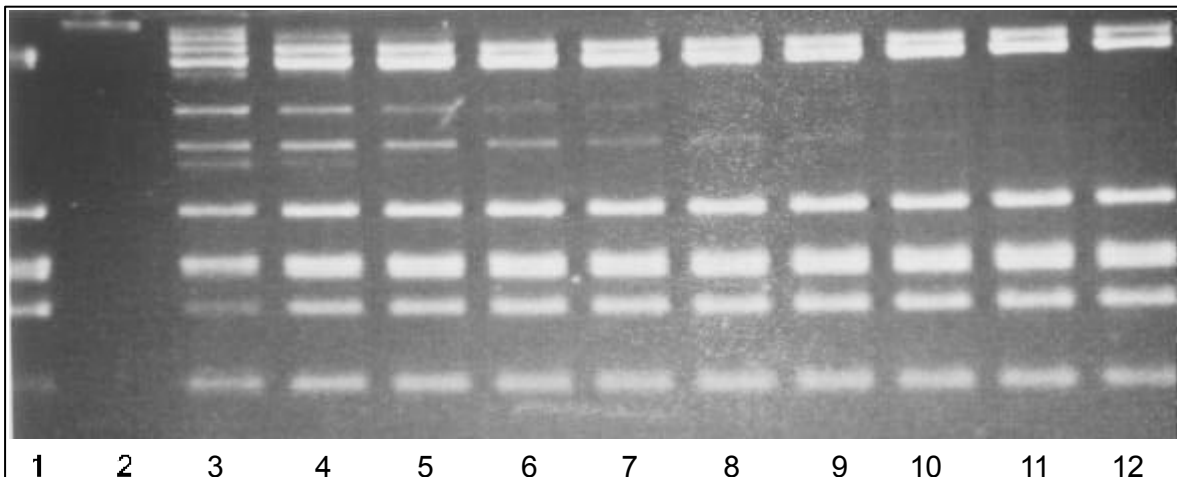


Abb. 16: Kinetik der Mutante K117E (1: λ -DNA / *EcoRI* ; 2: λ -DNA; 3-12 Zeitwerte 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10min; Enzymkonzentration im Test: 10nM).

Verglichen mit der Wildtypaktivität liegt die Aktivitäten der Mutanten K117E und K117Q lediglich um den Faktor 10 niedriger, während die Aktivitäten der Mutanten K117A, K117D und K117L um den Faktor 10^4 unter dem Wildtypniveau liegen.

3.1.2.4 Bindungsverhalten der K117-Mutanten

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Mutanten wurden Gelretardationsexperimente (2.4.4) durchgeführt (Abb. 17). Die ermittelten Bindungskonstanten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Enzym	$K_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$
wt <i>EcoRI</i>	$6,6 \times 10^7$
K117A	$6,8 \times 10^6$
K117D	nicht bestimmbar
K117E	$2,5 \times 10^8$
K117L	nicht bestimmbar
K117Q	$2,6 \times 10^7$

Tab. 11: Bindungsdaten der K117-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtypenzym.

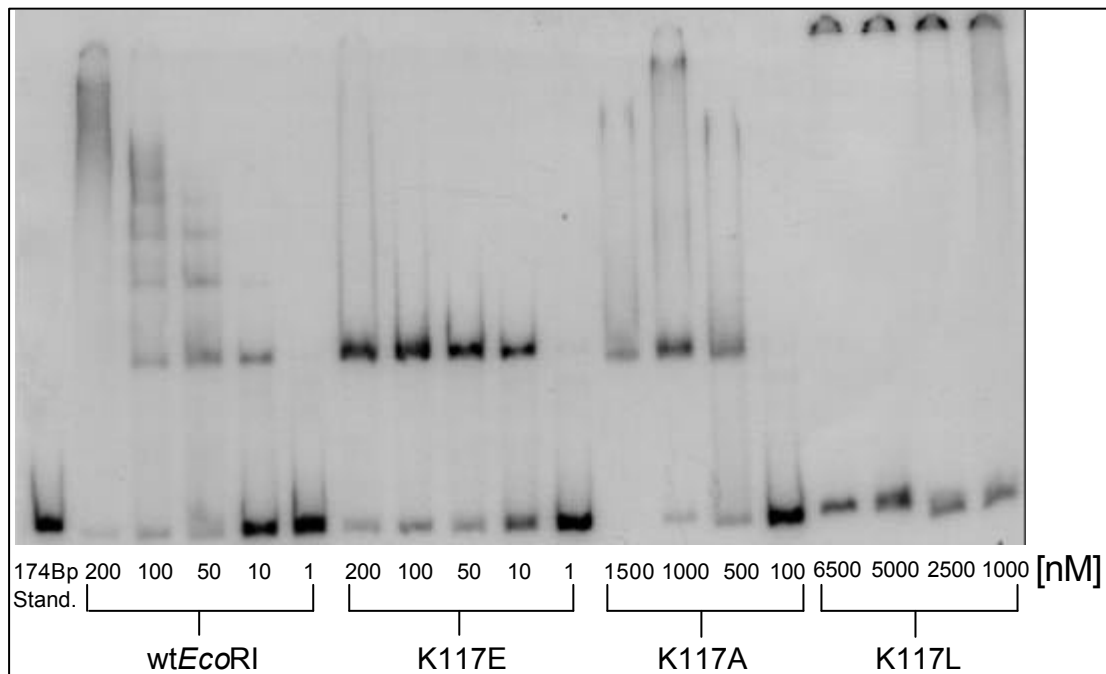


Abb. 17: Bindungs-experiment der K117-Mutanten und des *EcoRI*-Wildtypenzym. (Es wurde jeweils 1nM des 174Bp *Shift*substrat mit den in der Abbildung vermerkten Enzymkonzentrationen eingesetzt).

Die Mutante K117E zeigt im Vergleich zum Wildtypenzym eine um den Faktor 4 erhöhte Bindungsaktivität, während die Mutante K117Q eine Bindungskonstante auf Wildtypniveau besitzt und für K117A eine 10fach geringere Bindungskonstante im Vergleich zu *wtEcoRI* ermittelt wurde. Für K117D und K117L konnte keine Bindung detektiert werden. Aus der Abbildung 17 geht hervor, daß die unspezifische Bindung ist für K117E geringer ist als jene für das Wildtypenzym, was daran liegen kann, daß die zusätzliche negative Ladung die DNA-Bindung außerhalb der Erkennungssequenz stört.

Um die Frage zu klären, warum die Mutante K117E trotz des Austausches einer positiven gegen eine negative Ladung in unmittelbarer Nähe zum Phosphatrückgrat der DNA im Vergleich zu *wtEcoRI* nur eine um den Faktor 10 verringerte Spaltaktivität und sogar 4fach erhöhte Bindungsaktivität zeigt, wurde ein erneuter Bindungstest mit aufgereinigtem *Shift*substrat, welches von zweiwertigen Kationen gereinigt wurde, durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob der Glutamatrest an Position 117 möglicherweise ein Mg^{2+} -Ion, daß aus der *Shift*substratpräparation eingeschleppt wird, koordiniert und so die sonst an dieser Position befindliche Aminosäure Lysin imitieren kann. Allerdings muß die Mg^{2+} -Ionen-Menge unterhalb der Konzentration liegen, die das Enzym für die Spaltung benötigt, da sonst eine Spaltung des *Shift*substrates zu beobachten gewesen wäre. Für die Aufreinigung wurde das *Shift*substrat in Gegenwart von EDTA (gesättigte Lösung) mehrfach gewaschen, um das Mg^{2+} zu komplexieren und mit der Mutante K117E ein Bindungstest im Vergleich zu dem vorher verwendeten *Shift*substrat durchgeführt (Tab. 12).

Enzym	$K_{ass}[M^{-1}]$
K117E (Standard- <i>Shift</i> substrat)	$2,5 \times 10^8$
K117E(Mg^{2+} -freies <i>Shift</i> substrat)	$8,3 \times 10^8$

Tab. 11: Bindungskonstanten der Mutante K117E mit normal präpariertem und Mg^{2+} -freiem *Shift*-Substrat.

Mit dem von zweiwertigen Kationen befreiten *Shift*substrat wird sogar eine um den Faktor drei erhöhte Bindungskonstante für die Mutante K117E gemessen.

3.1.2.5 Einfluß einwertiger Kationen auf das Spaltverhalten von wt*EcoRI* und K117E

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß einwertige Kationen, wie beispielsweise Na^+ , von dem in der Mutante K117E eingeführten Glutamatrest positioniert werden und auf diese Weise das Lysin des Wildtypenzym nachahmen. Um den Einfluß einwertiger Kationen auf die Mutante K117E zu untersuchen, wurde sie umgepuffert und das Natrium im Aufbewahrungspuffer (PEDL / 50mM NaCl) gegen Kalium (50mM) oder Rubidium (50mM) ausgetauscht. Das Natriumion hat mit 99Å den kleinsten Radius, gefolgt von Kalium mit 138Å und Rubidium mit 152Å. Unter der Annahme, daß im Falle der Positionierung eines einwertigen Kations, der Radius des Kations einen Einfluß auf die Spaltaktivität haben könnte, wurden Spaltkinetiken (2.4.1) mit λ -DNA in einem dem jeweiligem Kation angepaßten Spaltpuffer angefertigt. Zum Vergleich wurde auch das Wildtypenzym mit den entsprechenden Kationen untersucht. Mit beiden Enzymen wurden Spaltexperimente (Abb. 16a und b) mit auf ähnliche Spaltgeschwindigkeit eingestellten Enzymkonzentrationen durchgeführt.

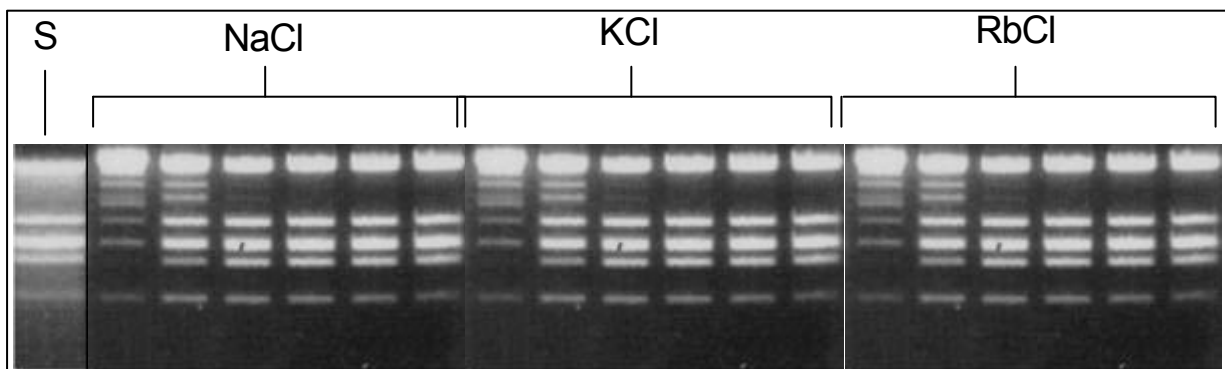


Abb. 18a: Spaltkinetiken von wt*EcoRI* mit verschiedenen einwertigen Kationen (S: λ -DNA / *EcoRI*).

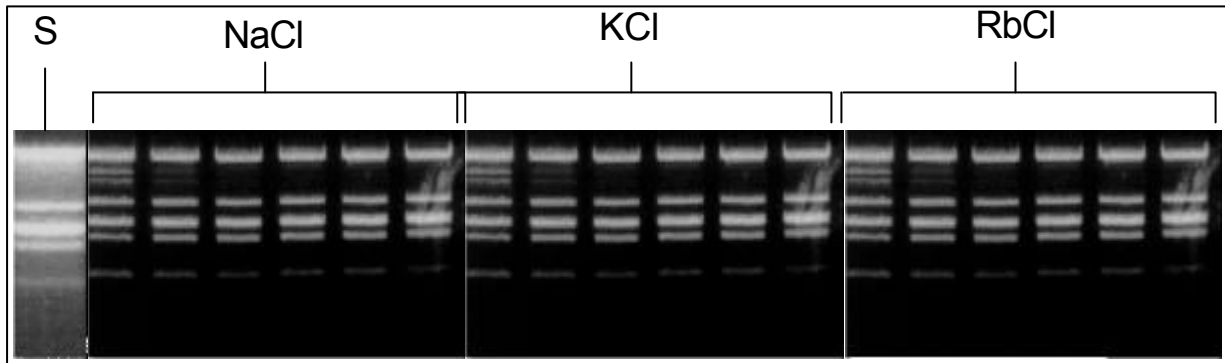


Abb. 18b: Spaltkinetiken von K117E mit verschiedenen einwertigen Kationen (S: λ -DNA / *EcoRI*).

Wie aus den Spaltkinetiken beider Enzyme hervorgeht, hat die Art des einwertigen Kations keinen Einfluß auf die Spaltaktivität.

3.1.2.6 pH-Wert-Abhängigkeit der Spaltaktivitäten der Mutanten K117D, K117E und K117Q

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Säure- und Säureamidreste an der Position 117 zu untersuchen, wurde die Spaltaktivität der Mutanten K117D, K117E, K117Q und von *wtEcoRI* in basischem Spaltpuffer (20mM Tris/ HCl pH 8,8 / 50mM NaCl / 10mM $MgCl_2$) mit λ -DNA als Substrat bestimmt (Tab. 14).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg] pH 8,8
<i>wtEcoRI</i>	$1,4 \times 10^6$
K117D	nicht bestimmbar
K117E	$3,7 \times 10^5$
K117Q	$1,0 \times 10^5$

Tab. 14: Spezifische Aktivitäten der verschiedenen K117-Mutanten und des Wildtypenzym bei pH 8,8.

Im Vergleich mit den Werten bei pH 7,5 (3.1.2.3) sind für das Wildtypenzym, sowie die Mutanten K117E und K117Q keine Einbußen in der spezifischen Aktivität aufgetreten. Für die Mutante K117D konnte keine spezifische Aktivität ermittelt werden, sie zeigte lediglich eine angedeutete Spaltung der λ -E-Spaltstelle. Allerdings

ist das Enzym auch unter kanonischen Spaltbedingungen (pH 7,5) nur sehr schwach aktiv.

3.1.3 Untersuchungen zu Phosphatkontakten der wtEcoRI und der K117-Mutanten mit modifizierten Oligonukleotiden

Der Einfluß des DNA-Phosphatrückgrates während der Sequenzerkennung und Hydrolyse wurde für *EcoRI* und auch *EcoRV* bereits mit mehreren modifizierten Oligonukleotid-Substraten untersucht [*EcoRI*.: Koziolkiewicz & Stec, 1992; Jeltsch *et al.*, 1993; *EcoRV*.: Thorogood *et al.*, 1996]. Bei den Substraten handelt es sich um Oligonukleotide, die eine Erkennungssequenz in der Mitte tragen, welche im allgemeinen von drei Basen flankiert ist. Innerhalb der Oligonukleotide sind die nicht an der Phosphatbrücke der DNA beteiligten Sauerstoffatome wie unten beschrieben durch andere Gruppen ersetzt. Meistens wurden dabei die Phosphatgruppen innerhalb der Basensequenz, sowie die erste Gruppe außerhalb, jeweils singulär Position für Position, ersetzt. Dabei wird jeweils nur eins der beiden zur Verfügung stehenden Sauerstoffatome substituiert, um stereoselektive Effekte zu untersuchen [Koziolkiewicz & Stec, 1992].

In Phosphothioaten ist eins der Sauerstoffatome gegen ein Schwefelatom ausgetauscht, was die konservativste Substitutionsmöglichkeit darstellt. Das Schwefelatom ist etwas größer als der Sauerstoff, wodurch die Phosphor-Schwefel-Bindung länger als die Phosphor-Sauerstoff-Bindung ist [Thorogood *et al.*, 1996]. Phosphothioate sind etwas saurer als Phosphate und haben deshalb möglicherweise einen anderen Solvatationsgrad. Weiterhin zeigen Phosphate eine Gleichverteilung der beiden negativen Ladungen, wogegen in Phosphothiaten die Ladung auf der Seite des Schwefels lokalisiert ist [Frey & Sammons., 1985].

In Phosphotriestern werden die freien Sauerstoffatome der Phosphatgruppen durch Ethoxy-Gruppen ersetzt, die zum einen die Ladung eliminieren und zum anderen ein größeres sterisches Hindernis darstellen [Thorogood *et al.*, 1996]. Dagegen wird in Methylphosphonaten zwar ebenfalls die Ladung eliminiert, jedoch kein großes sterisches Hindernis an der substituierten Position eingebracht.

Für *EcoRI* wurden Untersuchungen mit chiralen Phosphothioaten und Phosphotriestern durchgeführt [Koziolkiewicz & Stec, 1992], die in Abhängigkeit von

der Position der Modifikation, die DNA entweder vollständig oder zumindest signifikant gegen die Spaltung durch das Enzym schützen, sowie die Stereoselektivität des Enzyms nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse mit Phosphothioaten liegen auch für *EcoRV* vor [Thorogood *et al.*, 1996].

Vollständige Untersuchungen mit Methylphosphonaten wurden bisher nur für *EcoRV* durchgeführt, wo lediglich der Austausch innerhalb der letzten Position der Erkennungssequenz von dem Enzym toleriert wird [Lanio *et al.*, 1996]. Für *EcoRI* wurden bisher keine Untersuchungen mit Methylphosphonaten durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden alle Phosphate innerhalb der Erkennungssequenz, sowie die auf beiden Seiten flankierende Gruppe ausgetauscht und das Spalt- und Bindungsverhalten des Wildtypenzym und der Mutante K117E mit diesen Substraten untersucht.

3.1.3.1 Spalt- und Bindungsverhalten von wtEcoRI mit Methylphosphonat-Substraten

Die in Tab. 4 unter 2.4.3 aufgeführten selbstkomplementären dodekameren Methylphosphonat-Substrate, wurden am 3'-Ende mit $^{32}\text{P}[\text{ddATP}]$ radioaktiv markiert (2.4.4.1). Für die gewählten Reaktionsbedingungen (1 μM Oligonukleotid und 0,1 μM Enzym) wurde für das Wildtypenzym die apparente katalytische Umsatzrate $k_{\text{kat}(\text{app})}$ (Tab. 16) bestimmt. In Gelretardationsexperimenten (2.4.4.3) wurden die Bindungskonstanten K_{ass} von wtEcoRI mit den Methylphosphonatsubstraten bestimmt (Tab. 16).

Oligonukleotid	$k_{\text{kat}(\text{app})}$ [1/min]	K_{ass} [M^{-1}]
CTRL	30,40	$6,1 \times 10^6$
CG1-R	0,06	$< 10^4$
CG1-S	0,10	$6,0 \times 10^4$
GA-R	nicht bestimmbar	$9,1 \times 10^4$
GA-S	nicht bestimmbar	$2,1 \times 10^4$
AA-R	1,10	$4,7 \times 10^4$
AA-S	0,10	$2,8 \times 10^4$
AT-R	0,40	$< 10^4$
AT-S	nicht bestimmbar	$< 10^4$
TT-R	1,30	$< 10^4$
TT-S	1,10	$< 10^4$
TC-R	konnte nicht synthetisiert werden	-
TC-S	6,50	$< 10^4$
CG2-R	0,004	$< 10^4$
CG2-S	nicht bestimmbar	$1,4 \times 10^4$

Tab. 16: Bestimmung von $k_{\text{kat}(\text{app})}$ und K_{ass} von wtEcoRI mit Methylphosphonaten als Substrat.

Die Position des Methylphosphatrestes befindet sich jeweils zwischen den beiden Basen, die abgekürzt in dem Oligonukleotidnamen angegeben sind, wobei R und S das jeweilige Stereoisomer bezeichnen.

Verglichen mit dem unmodifizierten Oligonukleotid CTRL nimmt die Spaltaktivität für alle modifizierten Oligonukleotide ab. Die geringste Abnahme ist bei TC-S zu verzeichnen, welches fünffach schlechter gespalten wird als die Kontrolle, ein Ergebnis das sich nicht in den Bindungskonstanten widerspiegelt, da TC-S mehr als 100fach schlechter gebunden wird als CTRL. Das Methylphosphonat TC-R konnte aufgrund technischer Probleme nicht synthetisiert werden. WtEcoRI zeigt für alle anderen modifizierten Substrate eine wenigstens 10 - 1000fach reduzierte Spaltaktivität und auch wenigstens um den Faktor 100 reduzierte Bindungskonstanten. Sofern die Bindungskonstante mit $<10^4$ angegeben ist, konnte der exakte Wert nicht bestimmt werden, da die Proteine teilweise aufgrund zu hoher Konzentrationen im Bindungsassay ausfielen und nur eine näherungsweise Berechnung der maximal möglichen Bindungskonstante durchgeführt werden konnte.

3.1.3.2 Spalt- und Bindungsverhalten der Mutanten K117A, K117E und K117L mit Methylphosphonat-Substraten

Für die Mutanten K117A, K117E und K117L wurden Spalt- und Bindungsaktivitäten nur für die Methylphosphonate AT-R und AT-S, sowie der Kontrolle CTRL bestimmt (Tab. 17).

Enzym	CTRL		AT-R		AT-S	
	$k_{cat(app)}$ [1/min]	K_{ass} [M^{-1}]	$k_{cat(app)}$ [1/min]	K_{ass} [M^{-1}]	$k_{cat(app)}$ [1/min]	K_{ass} [M^{-1}]
wtEcoRI	30,35	$6,0 \times 10^6$	0,44	$< 10^4$	n.b.	$< 10^4$
K117A	0,55	$< 10^4$	n.b.	$< 10^4$	0,015	$< 10^4$
K117E	25,02	$2,6 \times 10^8$	2,14	$< 10^4$	n.b.	$< 10^4$
K117L	0,43	$< 10^4$	n.b.	$< 10^4$	n.b.	$< 10^4$

Tab. 17: Spalt- und Bindungsaktivitäten der K117-Mutanten mit CTRL, AT-R und AT-S als Substrat (n.b.: nicht bestimmbar).

Es sollte die Auswirkung der Ladungsentfernung an der Phosphatgruppe in der Mitte der Erkennungssequenz untersucht werden, für die ein Kontakt mit Lys117 denkbar ist.

Das Kontrolloligonukleotid CTRL wird durch das Wildtypenzym und die Mutante K117E mit etwa gleicher Geschwindigkeit gespalten, während die Mutanten K117A und K117L 100fach geringere Spaltaktivitäten aufweisen, was sich auch in den vergleichsweise niedriger Bindungskonstanten der beiden letzteren Mutanten widerspiegelt. Trotz der etwas niedrigeren Spaltaktivität von K117E im Vergleich zum Wildtypenzym, besitzt das Enzym eine 40fach höhere Bindungskonstante, was andeutet, daß eine Aktivitätssteigerung nicht mit steigenden Bindungskonstanten konform gehen muß. Sowohl AT-R als auch AT-S wurden von allen drei Mutanten, sowie dem Wildtypenzym mit sehr geringer Spaltrate oder gar nicht hydrolysiert, was auch von den nicht genau zu bestimmenden niedrigen Bindungskonstanten reflektiert wird. Die einzige Ausnahme bildet die relativ hohe Spaltaktivität von K117E auf dem Substrat AT-R. Hier zeigt die Mutante einen stereoselektiven Effekt, da AT-S nicht gespalten wird.

3.2 Erweiterung der Spezifität von *EcoRI*

Das Ziel in diesem Teil Arbeit ist die Änderung der Spezifität des Restriktionsenzym *EcoRI*, so daß anstatt der 6-Basenpaar- eine 8-Basenpaar-Sequenz spezifisch erkannt und gespalten wird. Dazu wurde nach einer Aminosäurereposition innerhalb des Enzyms gesucht, welche durch zielgerichtete Mutagenesen für die Einführung eines Basenkontaktes im Randbereich der Basensequenz geeignet ist. Mit einer Mutation an dieser Stelle sollte die Wildtyperkennungssequenz GAATTC jeweils um eine Base nach außen erweitert werden. Aus Untersuchungen der *EcoRI*-Kokristall-Struktur (siehe Brookhaven data bank; *entry* 1eri) wurde die Position Ile197 ausgewählt. Diese Position zeigt zwar nicht in die große Grube hinein, sondern zurück zu der Position Asn139, hat aber eine gute Lage oberhalb der großen Grube um einen zusätzlichen Basenkontakt zu ermöglichen (Abb. 19).

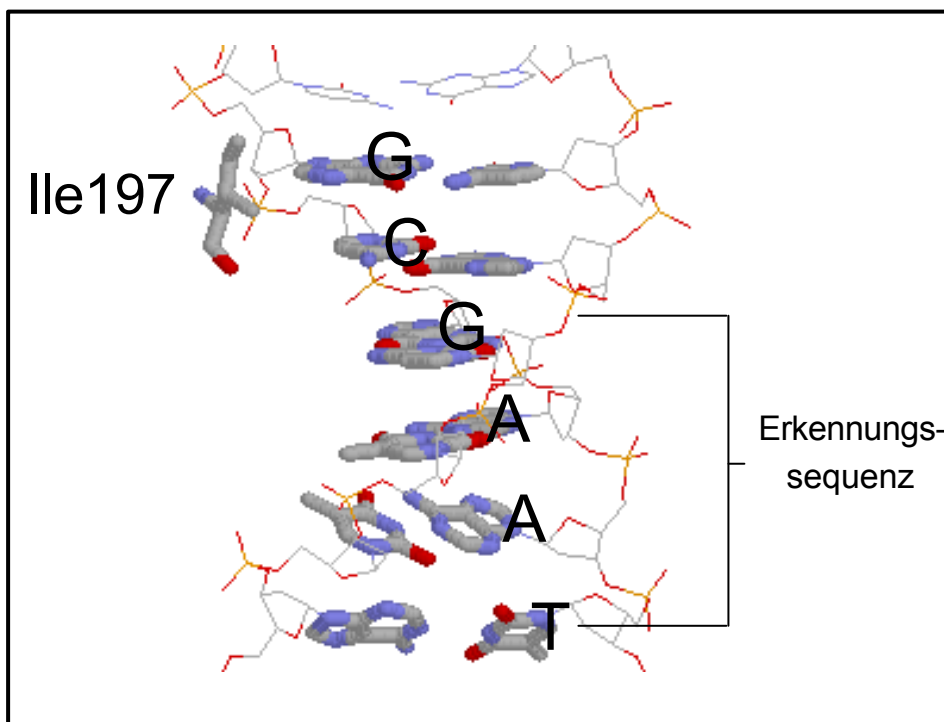


Abb. 19: Position der Aminosäure Ile197 im Kontext der Erkennungssequenz GAATTC (nur teilweise dargestellt).

Aus diesem Grund wurde zu Beginn das Isoleucin 197 durch die Aminosäuren Arginin (I197R), Glutamat (I197E) und Glutamin (I197Q) mit der Kapazität neue Basen zu kontaktieren, ersetzt. Ausgehend von der Mutagenese der Position I197 wurden anschließend weitere Positionen mutiert. Die Strategie, die auf diesem Weg der Spezifitätserweiterung eingeschlagen wurde, sowie die Charakteristika der generierten Mutanten sind im Anschluß Schritt für Schritt dargestellt.

3.2.1 Mutationen an der Position Ile197

Die Mutanten I197E, I197Q und I197R sowie alle weiteren unten beschriebenen Mutanten, im Rahmen der Spezifitätserweiterung von *EcoRI*, wurden nach dem Verfahren der PCR-Mutagenese (2.2.1.2), unter Verwendung der unter 2.2.2. aufgeführten Mutageneseprimer hergestellt. Dazu wurde in der ersten PCR über den Mutageneseprimer die Mutation in den Megaprimer eingebracht und in der zweiten PCR mit dem Megaprimer und den Primern A und B das gesamte *ecoRI*-Gen amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde nachfolgend mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SpeI* gespalten und in einen entsprechend präparierten Rahmen des Plasmides pRIF309+(His₆) kloniert. Nach der Transformation (2.1.4) von LK111(λ) – Zellen (2.1.1) wurde von einigen ausgewählten Klonen die Plasmid-DNA präpariert. Um zu verifizieren, daß die Mutation im *ecoRI*-Gen enthalten ist, wurden zunächst von spaltpositiven Plasmiden das ganze *ecoRI*-Gen sequenziert (2.2.3). Mit den positiven Klonen wurden Expressionstests (2.3.1) und anschließend eine Fermentation (2.3.2) im 10l-Maßstab durchgeführt. Die Aufreinigung Proteine erfolgte nach Ultraschallaufschluß (2.3.3), mit anschließender chromatographischer Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie (2.3.4.1) und eine Ionenaustauschchromatographie (2.3.4.2). Das aufgereinigte Protein wurde für eine längere Aufbewahrung gegen einen glycerinhaltigen Puffer dialysiert (2.3.6) und anschließend der Proteingehalt über UV-Spektroskopie (2.3.7), sowie die Reinheit über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.3.5) bestimmt. Da alle nachfolgend beschriebenen Mutanten nach dem gleichen Verfahren hergestellt wurden, wird auf eine Beschreibung des Herstellungsverfahrens im Ergebnisteil der jeweiligen Mutanten verzichtet.

3.2.1.1 CD-Daten der I197-Mutanten

Der Gehalt an Sekundärstrukturanteilen der *EcoRI*-Mutanten wurde über die Aufnahme eines CD-Spektrums (2.4.4.4) im Bereich 190-250nm bestimmt (Tab. 18). Im Vergleich mit den Sekundärstrukturanteilen des Wildtypenzym können Aussagen über die Faltung der mutierten Proteine getroffen werden.

Enzym	Konzentration [μM]	% α -Helix	% β -Faltblatt
wt <i>EcoRI</i>	4,4	39	16
I197E	8,0	36	17
I197Q	3,0	35	16
I197R	2,5	35	18

Tab. 18: Sekundärstrukturanteile des Wildtypenzym sowie der verschiedenen I197-Mutanten.

Im Vergleich entsprechen, im Rahmen der Meßgenauigkeit, die Sekundärstrukturanteile bei allen Mutanten jenen des Wildtypenzym.

3.2.1.2 Spalt- und Bindungsverhalten der I197-Mutanten

Die Spaltaktivität der Mutanten I197E, I197Q und I197R wurde mit λ -DNA als Substrat (2.4.1) bestimmt (Tab. 19). Das Bindungsverhalten der jeweiligen Mutanten wurde in Gelretardationsexperimenten (2.4.4) charakterisiert (Tab. 19). Der Verlauf einer exemplarischen λ -Kinetik (Abb. 16), sowie eines repräsentativen *Shift*-Gels sind unter 3.1.2 für die Mutante K117E dargestellt (Abb. 17).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
wtEcoRI	$1,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^9$
I197E	$2,7 \times 10^3$ *	keine Bindung
I197Q	$4,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^9$
I197R [#]	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^9$

Tab. 19: Spezifische Aktivitäten und Bindungskonstanten von wtEcoRI und den I197-Mutanten. Die Mutante I197E zeigt ein spezifisches Spaltpattern (*), allerdings werden die λ -B und λ D-Spaltstelle langsamer gespalten als die anderen drei Spaltstellen. ([#] Hergestellt von Dr. W. Küster [Küster *et al.*, 1999]).

Die Spaltkinetik der Mutante I197E (Abb. 20a) zeigt, daß sie die λ -B- und in geringerem Maße auch die λ -D-Spaltstelle (Abb. 20b) langsamer spaltet. Das Phänomen ist an den 10521Bp und 13225Bp großen Banden der Kinetik zu beobachten, die vergleichsweise lange als Zwischenprodukte erhalten bleiben.

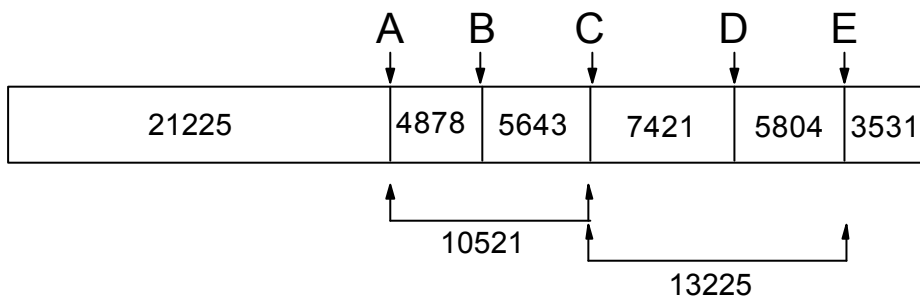


Abb. 20b: EcoRI-Spaltstellen auf λ -DNA (Angaben der Fragmentgrößen in Bp).

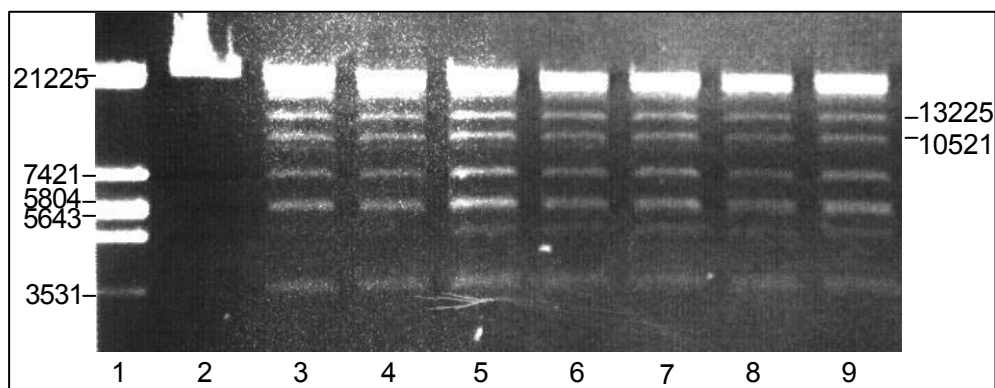


Abb. 20a: Spaltkinetik der Mutante I197E (1: λ -DNA / EcoRI; 2: λ -DNA; 3-9 verschiedene Zeitwerte der Kinetik 5min bis 6h).

Mit Ausnahme der Mutante I197E, die eine 600fach verringerte spezifische Aktivität gegenüber dem Wildtyp besitzt, zeigen die Mutanten I197 R und I197Q dem Wildtyp

vergleichbare bzw. nur um den Faktor 4 erniedrigte Aktivitäten. Das Ergebnis spiegelt sich ebenfalls in den Bindungsdaten wieder, wo die Mutanten I197Q und I197R Wildtypniveau zeigen, während für die sehr inaktive Mutante I197E keine Bindung detektiert werden konnte.

3.2.2 Zusätzliche Schwächung der Substraterkennung an der Position Ala142

Wie die unter 3.2.1 vorgestellten Mutanten zeigen, genügt es nicht; dem Enzym *EcoRI* außerhalb der Erkennungssequenz lediglich an der Position I197 neue Kontaktmöglichkeiten anzubieten, um die Spezifität von *EcoRI* zu erweitern. Alle Mutanten zeigen unverändert das typische *EcoRI*-Spaltmuster auf λ -DNA, nur die Mutante I197E zeigt eine leichte Selektivität und spaltet die λ -B- und λ -D-Spaltstelle langsamer. Ein denkbarer Grund für die unveränderte Spaltaktivität ist, daß das Enzym keine zusätzlichen Kontakte außerhalb der Erkennungssequenz benötigt, solange innerhalb der Erkennungssequenz alle Kontakte gebildet werden. Aus diesem Grund wurde im folgenden versucht, das Anbieten neuer Kontakte außerhalb der Basensequenz mit einer Schwächung der Erkennung innerhalb der Sequenz zu kombinieren. Zu diesem Zweck wurden die drei Doppelmutanten A142G/I197E, A142G/I197Q und A142G/I197R hergestellt. Die Mutation A142G betrifft das *Extended chain*-Motiv, das für die Substraterkennung verantwortlich ist. Die Einzelmutante A142G besitzt eine geringe spezifische Aktivität bei einer dem Wildtyp ähnlichen Bindungskonstante (Tab. 21). Mit der Abschwächung der Substraterkennung an der Position Ala142 sollen die möglichen Kontakte I197E, I197Q und I197R für das Enzym attraktiver gemacht werden.

3.2.2.1 CD-Daten

Die Sekundärstrukturanteile der Mutanten wurden in CD-Experimenten (2.4.4.4) bestimmt (Tab. 20).

Enzym	Konzentration [μM]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
A142G*	3,0	35	16
A142G/I197E	7,3	37	16
A142G/I197Q	1,0	36	18
A142G/I197R	0,9	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Tab. 20: Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Mutanten (* Daten aus Küster 1998).

Mit Ausnahme der Mutante A142G/I197R, für die aufgrund zu geringer Konzentration kein CD-Spektrum aufgenommen werden konnte, zeigen alle anderen Mutanten mit dem Wildtypenzym (3.2.1.1) vergleichbare Sekundärstrukturanteile.

3.2.2.2 Spalt- und Bindungsverhalten

Die Spaltaktivitäten (2.4.1) der Mutanten wurden mit λ -DNA als Substrat ermittelt (Tab. 21). Die Bindungskonstanten der Mutanten wurden im Gelretardationsexperimenten (2.4.4) bestimmt (Tab. 21).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
A142G*	$1,6 \times 10^3$	$8,0 \times 10^8$
A142G/I197E	$0,4 \times 10^3$	$5,2 \times 10^7$
A142G/I197Q	$2,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^8$
A142G/I197R	$1,8 \times 10^3$	$9,0 \times 10^5$

Tab. 21: Spalt und Bindungsdaten der verschiedenen Mutanten (* Werte aus Küster [1998]).

Die Spaltaktivitäten der Doppelmutanten liegen alle im Bereich der Einzelmutante A142G und sind etwa um den Faktor 1000 geringer als beim Wildtypenzym (3.2.1.2). Die Bindungskonstanten sind bei der Mutante A142G/I197Q etwa 1000fach, bei

A142G/I197E etwa 100fach und bei A142G/I197Q und A142G 6fach unterhalb des Wildtypniveaus. Verglichen mit den relativ hohen spezifischen Aktivitäten der Einzelmutanten I197Q und I197R (3.2.1.2) setzen sich in den Doppelmutanten die Eigenschaften der Mutante A142G durch. Bei allen Doppelmutanten ist keine erhöhte Selektivität innerhalb der Spaltkinetik zu beobachten.

3.2.3 Ausrichtung der Position I197Q in die große Grube

Die Abschwächung in der Substraterkennung von *EcoRI* in Verbindung mit dem Angebot neuer Kontaktmöglichkeiten außerhalb der Erkennungssequenz reicht nicht aus, um ein Enzym zu generieren, das eine Spezifitätserweiterung andeutet. Da möglicherweise auch ein großer Aminosäurerest an der Position 197 mehrere Konformationen in der großen Grube annehmen kann, können mit verschiedenen Basenpaaren äquivalente Wechselwirkungen eingegangen werden. Eine Möglichkeit den Rest an Position 197 in der großen Grube auszurichten, ist die Kombination mit einem weiteren Aminosäurerest als zusätzlichem Bindungspartner in unmittelbarer Umgebung. Zu diesem Zweck wurden die Mutanten A138D/I197Q und A138N/I197Q hergestellt, die die Möglichkeit schaffen, ein Netzwerk von Bindungen zwischen den Aminosäureresten und der DNA zu generieren, welche den Rest I197Q in der großen Grube ausrichten und damit neue Kontakte ermöglichen. Abbildung 21 zeigt ein mit dem Programm Swiss PDB-View simuliertes Bindungs-Netzwerk der Mutante A138N/I197Q.

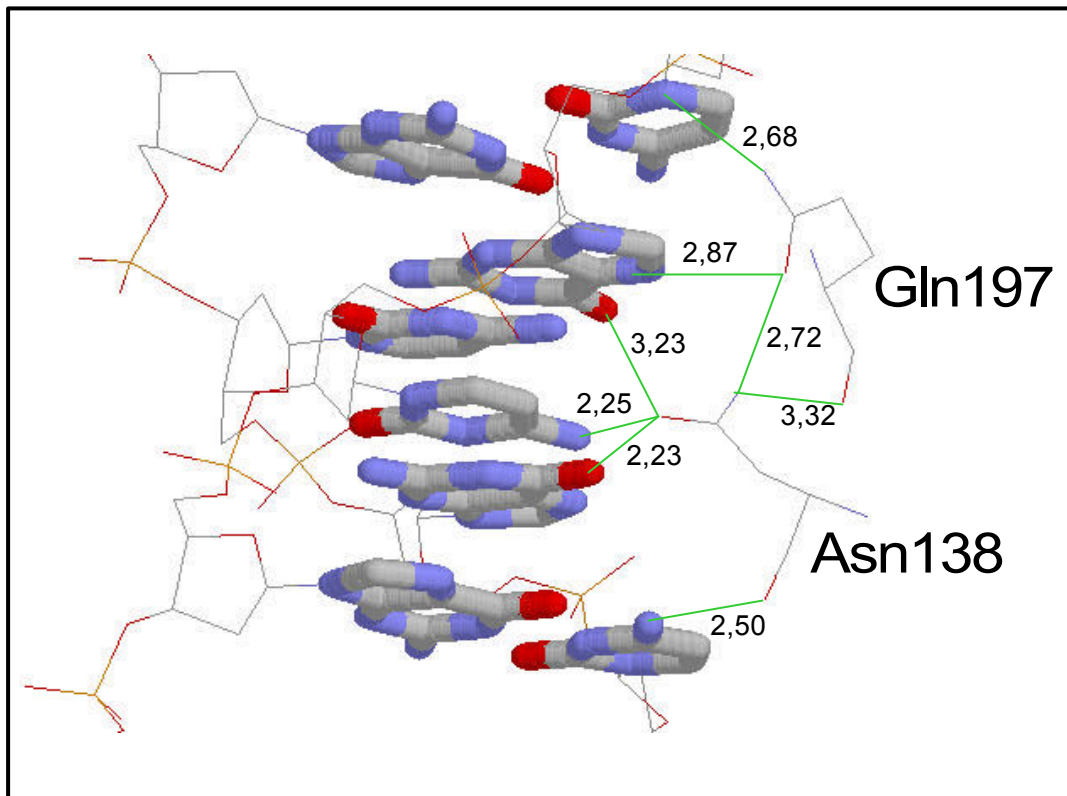


Abb. 21: Potentielles Bindungsnetzwerk der Mutante A138N/I197Q mit den Basen am Rand der *EcoRI*-Erkennungssequenz (die Zahlen geben die Abstände in Angström an).

Um die Anzahl der Mutanten in einem angemessenen Rahmen zu halten, wurde als Aminosäurerest an Position 197 das Glutamin ausgewählt, da die Einzelmutante I197Q sehr viel aktiver als I197E ist und da ein Glutaminrest mehr Möglichkeiten bietet ein Netzwerk auszubilden (Abb. 21), als der Argininrest, was in einer Modellbildung mit dem Programm Swiss PDP-View simuliert wurde.

In einem weiteren Ansatz wurden die Positionen A138N und I197Q oder I197R mit der Mutation M137Q kombiniert. Die Einzelmutante M137Q [Küster, 1998] ist in der Lage, einen Kontakt zu einem Thymin anstelle des Cytosins in der *EcoRI*-Erkennungssequenz auszubilden, und stellt somit einen möglichen Ausgangspunkt für die Erweiterung oder Änderung der Spezifität dar. Desweiteren läßt sich der Glutaminrest an Position 137 mit dem Netzwerk zwischen den Positionen 138 und 197 kombinieren. In diesem Kontext wurden die Mutanten M137Q/A138N, M137Q/A138N/I197Q und M137Q/A138N/I197R hergestellt und charakterisiert.

3.2.3.1 CD-Daten

Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Mutanten erfolgte wie beschrieben (2.4.4) in CD-Experimenten (Tab. 22).

Enzym	Konzentration [μM]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
A138D/I197Q	0,8	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
A138N/I197Q	4,1	35	18
M137Q/A138N	18,0	36	18
M137Q/A138N/I197Q	11,1	39	16
M137Q/A138N/I197R	7,4	37	15

Tab. 22: Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Netzwerk bildenden Mutanten.

Aufgrund der zu geringen Konzentration konnte von der Mutante A138D/I197Q kein CD-Spektrum aufgenommen werden. Die Sekundärstrukturanteile der weiteren Mutanten entsprechen, im Rahmen der Meßgrenzen, jenen des Wildtypenzym (3.2.1.1).

3.2.3.2 Spalt- und Bindungsdaten

In Tabelle 23 sind für die verschiedenen Mutanten die spezifischen Aktivitäten (2.4.1) und die Bindungskonstanten (2.4.4) aufgeführt.

Enzym	Spezif. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
A138D/I197Q	$4,0 \times 10^5$	keine Bindung
A138N/I197Q	$1,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^9$
M137Q/A138N/I197Q	$1,0 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$
M137Q/A138N/I197R	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
M137Q/A138N	Starspaltung	$7,7 \times 10^7$

Tab. 23: Spalt- und Bindungsdaten der Netzwerk bildenden Mutanten.

Die Spaltaktivität von A138N/I197Q befindet sich auf Wildtypniveau (3.2.1.2), während A138D/I197Q um den Faktor 4 weniger aktiv ist. Das spiegelt sich ebenfalls in den Bindungskonstanten wider. Dabei zeigt sich auch der Unterschied in der Detektierbarkeit thermodynamischer und kinetischer Reaktionsparameter. Aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen der Mutante A138D/I197Q wird die DNA-Bindung durch zusätzliche Abstoßungskräfte soweit geschwächt, dass die Konzentration des DNA-Enzym-Komplexes für einen Nachweis im Bindungstest zu gering ist, wogegen das Spaltereignis auch für diesen Konzentrationsbereich detektierbar bleibt.

Auch im Falle der Mutanten M137Q/A138N/I197Q und M137Q/A138N/I197R konnte keine Erweiterung der Spezifität erzielt werden. Die Dreifachmutanten zeigen das kanonische Spaltmuster und gehen anschließend schnell in Starspaltaktivität über. Die Mutante M137Q/A138N zeigt von Beginn an Staraktivität auch unter kanonischen Bedingungen, was auf einen starken Einfluss der mutierten Position 138 (3.2.4.2) hindeutet, da für Mutanten in diesem Bereich, speziell für A138V eine starke Staraktivität beschrieben ist [Heitmann, 1990]. Bei den Mutanten M137Q/A138N/I197Q und M137Q/A138N/I197R handelt es sich um sehr aktive Enzyme, deren Spaltaktivitäten und Bindungsverhalten im Bereich des Wildtypenzymys liegen, die aber auch stark von der Position 138 geprägt sind. Abbildung 22 zeigt diese erhöhte Starspaltaktivität beispielhaft an der Kinetik von M137Q/A138N/I197Q.

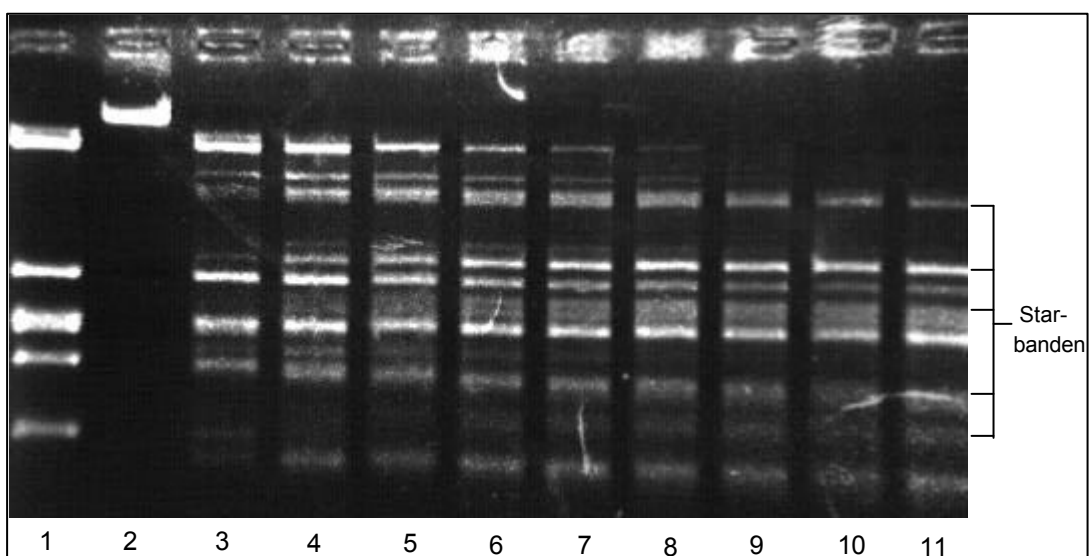


Abb. 22: Spaltkinetik M139Q/A138N/I197Q (1: λ -DNA / EcoRI, 2: λ -DNA; 3-11 Zeitwerte 10min –90min alle 10min).

3.2.4 Kombination von Ausrichtung der mutierten Position Gln197 mit einer Schwächung der Substraterkennung

Da die angestrebte Ausrichtung der Position 197 in die große Grube nicht zu einer erweiterten Spezifität geführt hat und sich die Mutanten A138D/I197Q und A138N/I197Q Mutanten nur unwesentlich vom Wildtyp unterscheiden, wurde mit den Mutanten A138N/N141A/I197Q und A138N/N141S/I197Q die Ausrichtung von der Position Gln197 mit einer zusätzlichen Abschwächung der Substraterkennung im *Extended chain*-Motiv kombiniert. Für die Schwächung während der Substraterkennung wurde diesmal die Position N141 ausgewählt. Bei der Einzelmutante Asn141A handelt es sich um eine unter kanonischen Bedingungen gänzlich inaktive Mutante, die unter Mn^{2+} -Bedingungen (2.4.1) ein kanonisches Spaltmuster bei geringer Aktivität ($1,5 \times 10^2$ U/mg) zeigte [Fritz, 1994]. Die Einzelmutante N141S zeigte unter kanonischen, sowie auch unter Mn^{2+} -Bedingungen eine spezifische Aktivität von ca. 10^4 U/mg.

3.2.4.1 CD-Daten

Die Überprüfung der Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Mutanten erfolgte im CD-Experiment (2.4.4.4) (Tab. 24).

Enzym	Konzentration [μ M]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
A138N/N141A/I197Q	15	33	16
A138N/N141S/I197Q	19	32	17

Tab. 24: Sekundärstrukturanteile der Mutanten A138N/N141A/I197Q und A138N/N141S/I197Q

Die Sekundärstruktur beider Mutanten entspricht jenen der Wildtyp-*EcoRI* (3.2.1.1).

3.2.4.2 Spalt- und Bindungsverhalten

Die spezifischen Aktivitäten (2.4.1) und die Bindungskonstanten (2.4.4) der verschiedenen Mutanten sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
A138N/N141A/I197Q	Starspaltung	$5,8 \times 10^7$
A138N/N141S/I197Q	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^8$

Tab. 25: Spalt und Bindungsdaten der verschiedenen Mutanten.

Die bereits beschriebene ausgeprägte Staraktivität von A138V, die auch für andere in unserem Labor hergestellten Mutanten der Position 138 beobachtet wurde, bestimmt auch das Spaltverhalten Mutante A138N/N141A/I197Q. In der Mutante A138N/N141S/I197Q spiegeln sich dagegen die Charakteristika der Mutante N141S wider, die eine spezifische Aktivität im Bereich 10^4 U/mg besitzt.

3.2.5 Vergrößerung der Reichweite der mutierten Position Gln197 in die große Grube

Alle bisherigen Versuche die Spezifität von *EcoRI* zu erweitern, zeigten keine Nutzung neuer Kontakte im Randbereich der Erkennungssequenz durch die Enzyme, vielmehr waren alle hergestellten Mutanten eher durch die Einflüsse der Mutationen im Inneren der Erkennungssequenz charakterisiert. Eine weitere mögliche Ursache dafür das keine neuen Kontakte geknüpft wurden ist, daß der Aminosäurerest an der Position 197 nicht nahe genug an die DNA heranreichte, um Bindungen zu bilden. Deshalb wurden nachfolgend Mutanten hergestellt, in denen die Position 197 näher an die DNA gelangt. Abbildung 23 zeigt, daß die Position Ile197 an der Spitze eines *Loops* liegt, der nachfolgend durch gezielte Insertionen verlängert wurde. Dazu wurden mit dem Verfahren der PCR-Mutagenese die Mutanten GlyA/I197Q, GlyB/I197Q und GlyAB/I197Q hergestellt, die unterschiedliche Glycininsertionen benachbart zur Mutation I197Q tragen. Bei der Mutante GlyA/I197Q ist zwischen der Position 196 und 197, bei der Mutante GlyB/I197Q zwischen Position 197 und 198 und bei der Mutante GlyAB/I197Q an beiden Positionen die Aminosäure Glycin eingefügt worden. In Abbildung 23 sind die Positionen an denen ein Glycin eingefügt werden soll markiert.

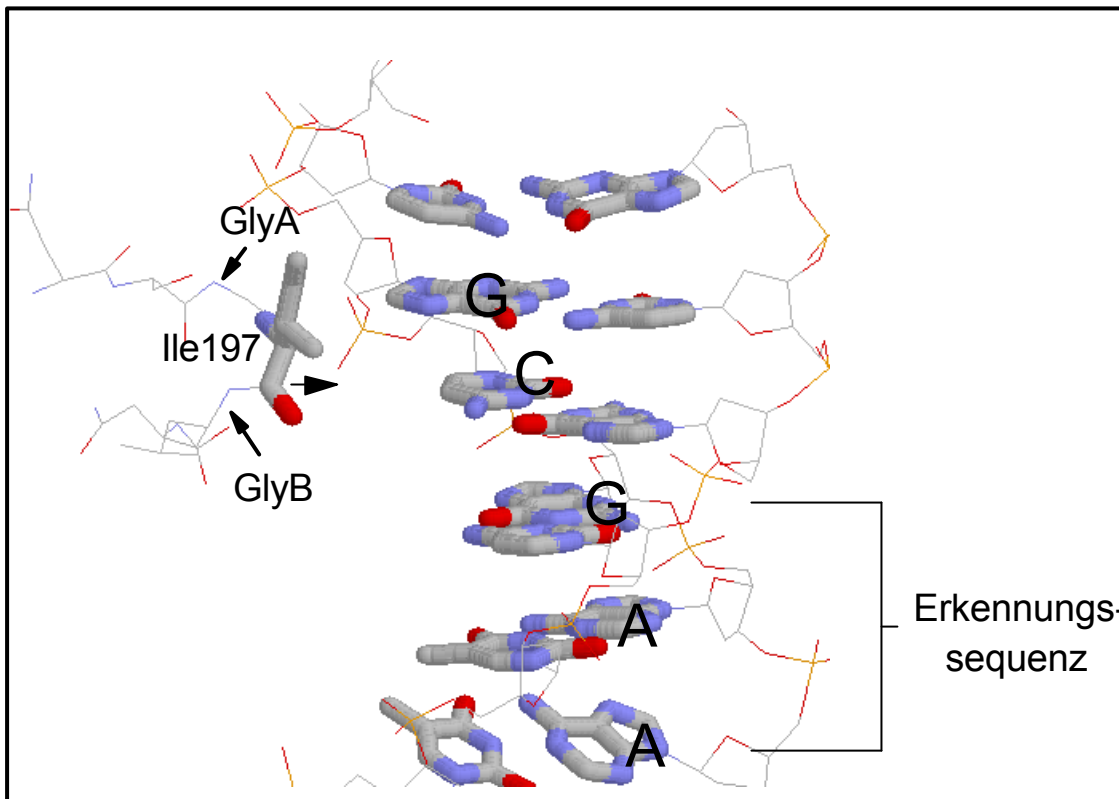


Abb. 23: Teil der *EcoRI*-Erkennungssequenz mit äußerem Randbereich der DNA, sowie der Position I197Q und der sie umgebenden Region. GlyA und GlyB markieren die Positionen an denen ein Glycin insertiert wurde.

3.2.5.1 CD-Daten

Der Gehalt an Sekundärstrukturanteilen wurde aus CD-Spektren (2.4.4.4) ermittelt (Tab. 26).

Enzym	Konzentration [μM]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
GlyA/I197Q	3,0	33	16
GlyB/I197Q	3,5	40	15
GlyAB/I197Q	1,8	36	18

Tab. 26 Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Insertionsmutanten.

Im Rahmen der Meßgenauigkeit liegen alle Sekundärstrukturanteile der Mutanten im Bereich des Wildtypenzym (3.2.1.1)

3.2.5.2. Spalt- und Bindungsverhalten:

Die Spalt- und Bindungsaktivitäten wurden wie unter 2.4.1 und 2.4.4 beschrieben bestimmt (Tab. 27).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
GlyA/I197Q	eingeschränktes Spaltnmuster	keine Bindung
GlyB/I197Q	keine Aktivität	keine Bindung
GlyAB/I197Q	$5,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$

Tab. 27: Spalt und Bindungsdaten der Insertionsmutanten.

Im Vergleich liegt die Spaltaktivität der Mutante GlyAB/197Q um den Faktor 3,5 unter dem Wildtypenzym (3.2.1.2), wogegen die Bindungskonstante (3.2.1.2) sogar um den Faktor 3000 erniedrigt ist. Die Mutante GlyA/I197Q zeigt ein eingeschränktes Spaltverhalten in der Kinetik (Abb. 24), sie spaltet die λ -B-Spaltstelle nicht, ist aber an den anderen vier Spaltstellen relativ aktiv. Das Fehlen der 5643Bp und 4878Bp Banden in der Spaltkinetik, sowie die Bande bei 10521Bp zeigen, daß die λ -B-Spaltstelle nicht gespalten wird. Die Mutante GlyB/I197Q ist gänzlich inaktiv, was sowohl in den Spalt- als auch den Bindungsdaten ausgedrückt wird.

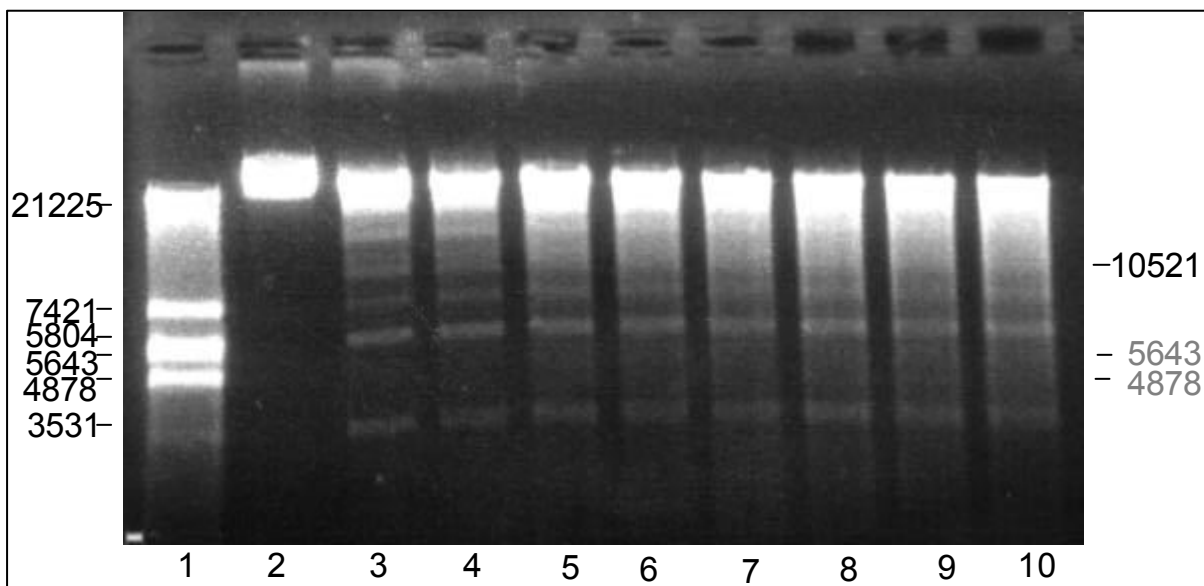


Abb. 24: Kinetik der Mutante GlyA/I197Q (1: λ -DNA / *Eco*RI; 2: λ -DNA; 3-10 Zeitwerte 15-120min, je 15min, Zahlen : DNA-Fragmentgrößen in Bp, grau: fehlende DNA-Fragmente).

3.2.6 Kombination von Ausrichtung oder Schwächung der Erkennung mit einer I197Q mit vergrößerter Reichweite

Ausgehend von der Annahme, daß die Position 197 durch eine Verlängerung des sie beinhaltenden *Loops* nahe genug an die DNA heranreicht, um neue Kontakte zu bilden, wurde im folgenden versucht, durch eine Abschwächung im *Extended chain*-Motiv zum einen und mit der Einbindung der Position 197 in einen Sequenzkontext zum anderen, solche Kontakte zu stabilisieren. Es wurden dazu die Tripelmutanten A138N/GlyAB/I197Q und A142G/GlyAB/I197Q hergestellt und charakterisiert. Obwohl die Mutante GlyAB/I197Q keine eingeschränkte Spaltaktivität auf λ -DNA zeigt, wurde sie, aufgrund noch vorhandener hoher Spaltaktivität der Mutante GlyA/I197Q mit eingeschränktem Spaltmuster vorgezogen.

3.2.6.1 CD-Daten

Die Sekundärstrukturanteile der Mutanten A138N/GlyAB/I197Q und A142G/GlyAB/I197Q wurden wie beschrieben (2.4.4.4) bestimmt (Tab. 28).

Enzym	Konzentration [μ M]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
A138N/GlyAB/I197Q	1,4	34	18
A142G/GlyAB/I197Q	0,7	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Tab. 28: Sekundärstrukturanteile der Mutanten A138N/GlyAB/I197Q und A142G/GlyAB/I197Q.

Die Sekundärstrukturanteile der Mutante A138N/GlyAB/I197Q entsprechen innerhalb der Meßgenauigkeit jenen des *EcoRI*-Wildtypenzym (3.2.1.1). Für die Mutante A142G/GlyAB/I197Q sind die Sekundärstrukturanteile aufgrund der geringen Konzentration nicht bestimmbar.

3.2.6.2 Spalt und Bindungsverhalten

Für die Charakterisierung der Mutanten wurden gemäß 2.4.1 und 2.4.4 Spalt- und Bindungsaktivitäten bestimmt (Tab. 29).

Enzym	Spez. Aktivität [U/mg]	K_{ass} [M^{-1}]
A138N/GlyAB/I197Q	eingeschränktes Spaltnmuster	keine Bindung
A142G/GlyAB/I197Q	keine Aktivität	keine Bindung

Tab. 29: Spalt- und Bindungsdaten von A138N/GlyAB/I197Q und A142G/GlyAB/I197Q.

Die Mutante A142G/GlyAB/I197Q ist gänzlich spalt- und bindungsaktiv, was durch die abweichende Sekundärstruktur des Proteins (3.2.6.1.) zumindest mitbedingt ist. Die Mutante A138N/GlyAB/I197Q dagegen zeigt ein sehr eingeschränktes Spaltverhalten. Von den fünf *EcoRI*-Spaltstellen auf λ -DNA werden nur zwei gespalten. Die Abbildung 25 zeigt die Spaltkinetik der Mutante A138N/GlyAB/I197Q. Anstatt der 6 Banden bei 21225Bp, 7412Bp, 5804Bp, 5643bp, 4878Bp und 3531Bp (Abb. 20b) zeigt das Spaltnmuster nur drei Banden denen die Größen von 31746Bp (überlagert durch Anteil nicht gespaltenen Substrates), 13225Bp und 3531Bp zuzuordnen sind. Das bedeutet, dass nur die λ -C- und die λ -E-Spaltstellen gespalten wurden.

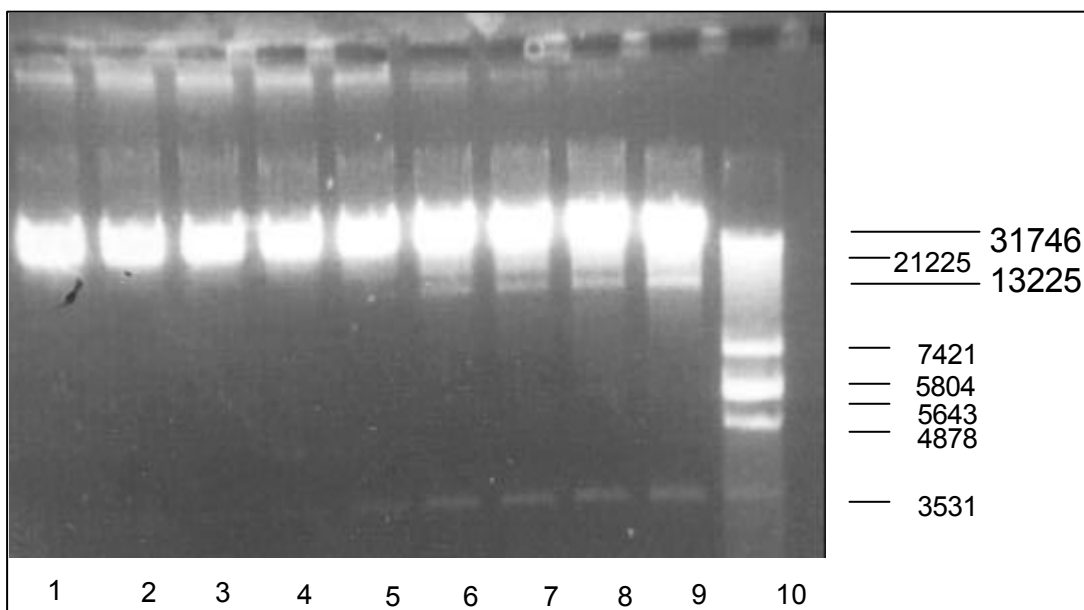


Abb. 25: Spaltkinetik der Mutante A138N/GlyAB/I197Q (10: λ -DNA / *EcoRI* gespalten; 1-9: Zeitwerte 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120min).

In Abbildung 26 ist die Sequenzumgebung jeweils drei Basen vor und nach der Erkennungssequenz der *EcoRI*- λ -DNA-Spaltstellen angegeben. Die erste Base außerhalb der Erkennungssequenz ist bei der λ -C- und der λ -E-Spaltstelle identisch,

so daß die bevorzugte nach außen um eine Base erweiterte Erkennungssequenz das achter Palindrom TGAATTCA sein könnte.

+1+2+3		-1-2-3		
TGA	GAATTC	GGC		λ -A Schnittstelle
AAT	GAATTC	TAA		λ -B Schnittstelle
AGT	GAATTC	AAA		λ -C Schnittstelle
AGA	GAATTC	TGG		λ -D Schnittstelle
CCT	GAATTC	AAT		λ -E Schnittstelle

Abb. 26: Umgebung der *EcoRI*-Erkennungssequenzen auf λ -DNA.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Bedeutung von Phosphatkontakten für die Spezifität und katalytische Aktivität von *EcoRI*.

Während der spezifischen Erkennung der Basensequenz GAATTC durch die Restriktionsendonuklease *EcoRI* werden eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen der DNA und dem Enzym ausgebildet. Die Summe der Kontakte setzt sich zusammen aus Wasserstoffbrückenbindungen die teilweise auch wasservermittelt sind und hydrophoben Interaktionen zwischen Aminosäureresten und den Basen der Erkennungssequenz und aus Kontakten zwischen Aminosäureresten und dem Phosphatrückgrat. Die Basenkontakte werden als *Direct readout* bezeichnet und die letzteren Wechselwirkungen als *Indirect readout*. In dieser Arbeit wurden einzelne Phosphatkontakte auf ihre Wichtigkeit für die DNA-Bindung und -Spaltung untersucht. Bei den charakterisierten Phosphatkontakten handelt es sich um den Nachweis einer potentiellen Bindungstasche für zweiwertige Kationen in der Mutante K130E (4.1.1), sowie um die Untersuchung eines postulierten Kontaktes der Aminosäure Lys117. Weiterhin wurden Phosphatkontakte des *EcoRI*-Wildtypenzym durch Spalt- und Bindungsexperimente mit Methylphosphonaten untersucht. Durch die Blockade der Kontaktmöglichkeit der Phosphatgruppen innerhalb und flankierend zur Erkennungssequenz sollen Rückschlüsse auf die Bedeutung der untersuchten Positionen für den *Indirect readout* ermöglicht werden.

4.1.1 Untersuchung einer potentiellen Metallionen-Bindungsstelle in unmittelbarer Umgebung der *Inner arm*-Region der Mutante K130E.

Aus dem Bindungsverhalten der Mutante K130E, die im Gegensatz zum Wildtypenzym nur in Gegenwart von zweiwertigen Kationen an DNA bindet [Windolph *et al.*, 1997b], wurde postuliert, daß eine zweite Metallionen-Bindungsstelle außerhalb derjenigen im aktiven Zentrum vorhanden sein sollte. Daß der Glutamatrest an Position 130 durch direkte Positionierung eines zweiwertigen Kations das ausgetauschte Lysin imitiert, kann ausgeschlossen werden, da auch die Mutante K130A nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen bindet. Unter der Annahme, daß der Verlust einer positiven Ladung an der Position 130 in der unmittelbaren

Nähe kompensiert werden sollte, wurde postuliert, daß das Motiv Asp133-Gln134-Asp135, das dem typischen Ca^{2+} -Bindungsmotiv [Schneider-Mergener *et al.*, 1996] Asp-Xaa-Asp entspricht, möglicherweise diese Bindungsstelle ist [Windolph *et al.*, 1997b].

Durch gezielte Mutagenese wurden die Mutanten K130E/D133A, K130E/D135A und K130E/D133A/D135A mit dem Ziel hergestellt, diese potentielle Metallionen-Bindungsstelle zu zerstören und so bindungsinactive oder sehr schlecht bindende Mutanten zu generieren.

Die Mutanten zeigen eine Sekundärstrukturzusammensetzung die dem Wildtypenzym entspricht, mit Ausnahme der Mutante K130E/D133A/D135A, die in zu geringer Konzentration vorlag, um gemessen zu werden. Allerdings weist diese Mutante Spalt- und Bindungsaktivität auf, was keine weitreichenden Strukturveränderungen erwarten läßt, die ansonsten mit hoher Wahrscheinlichkeit zu inaktiven bzw. unlöslichen Proteinen führen würden. Die Bestimmung der Aktivität wurde zuerst auf dem Substrat λ -DNA durchgeführt. Hier zeigt die Mutante K130E für die λ -Spaltstellen A,C,D und E eine spezifische Aktivität von 2×10^5 U/mg, spaltet allerdings die λ -Spaltstelle B langsamer und hat für alle fünf Spaltsequenzen eine spezifische Aktivität von 3×10^4 U/mg [Windolph *et al.*, 1997b]. Der Effekt, daß bestimmte Spaltstellen bevorzugt gespalten werden, hat sich in den Doppel- und Dreifach-mutanten noch verstärkt und führt dazu, daß für dies Substrat kein vollständiges Spaltpattern detektiert und damit keine spezifische Aktivität bestimmt werden konnte. Die starke Verlangsamung der Spaltgeschwindigkeit der λ -B-Spaltstelle ist kein Einzelfall und wurde bereits für andere *EcoRI*-Mutanten beobachtet. Dazu gehören z.B. Mutanten mit Mutationen von Phosphatkontakten wie R203K [Oelgeschläger, 1992] oder Basenkontakten wie N141A [Fritz *et al.*, 1998], aber auch einige Mutanten denen keine eindeutige Funktion zuzuordnen ist, wie D133A und D135H [Oelgeschläger, 1992] aus dem in dieser Arbeit untersuchtem Bereich.

Um eine eindeutige Aussage über die Aktivität der Mutanten zu treffen, wurde als Substrat für die Aktivitätsbestimmung das Plasmid pUC8 mit nur einer *EcoRI*-Spaltstelle gewählt. Ausgehend von der Aktivität der Mutante K130E auf diesem Plasmid sollte das Spaltverhalten der anderen Mutanten betrachtet werden. Die Mutante K130E/D133A hat eine 30fach und die Mutanten K130E/D135A und

K130E/D133A/D135A haben eine 500fach gegenüber der Mutante K130E verringerte Spaltaktivität.

Im Bindungstest ohne zweiwertige Kationen im Ansatz, zeigen alle Mutanten keine DNA-Bindung, was den Einfluß der Mutante K130E widerspiegelt. Im Bindungstest mit Ca^{2+} -Ionen im Ansatz, die Bindung ermöglichen, aber nicht zur Spaltung führen, zeigen sich auch nur geringe Unterschiede. Die Mutante K130E/D133A hat eine Bindungskonstante auf gleichem Niveau und die Mutanten K130E/D135A und K130E/D133A/D135A haben nur eine 10fach erniedrigte Bindungskonstante. Alle benötigen aber Ca^{2+} zur sequenzspezifischen Bindung. Auch wenn die beiden Mutanten K130E/D135A und K130E/D133A/D135A deutlich von der Aktivität der K130E abweichen, zeigen die gleichbleibend hohen Bindungskonstanten, daß keine für die Bindung wichtigen Positionen zerstört wurden. Der Aktivitätsverlust kann auf eine Störung der konformationellen Kopplung von Erkennung und Katalyse zurückgeführt werden und ist nicht ungewöhnlich, da die Wahrscheinlichkeit, inaktive Enzyme zu generieren, mit der Zahl der Mutationen steigt. Somit ist es nicht gelungen, durch zielgerichtete Mutationen an den Positionen 133 und 135 die Bindung der Mutante K130E stark herabzusetzen oder zu inaktivieren. Damit ist auszuschließen, daß das Asp133-Gln134-Asp135-Motiv eine zweite Metallionen-Bindungsstelle darstellt, die für die Regeneration der Bindungsfähigkeit der Mutante K130E verantwortlich wäre. Da in der weiteren Umgebung der Position 130 keine andere potentielle Metallionen-Bindungsstelle erkennbar ist, muß es sich bei dem Effekt der Regeneration der DNA-Bindungsfähigkeit der Mutanten durch zweiwertige Kationen um ein Phänomen handeln, das aus größerer Distanz wirkt. Es ist denkbar, daß zweiwertige Kationen die allgemeine Konformation des Enzyms verändern und es so in einen DNA-bindungsfähigen Zustand bringen.

Abbildung 27 zeigt schematisch eine solche Abhängigkeit der DNA-Bindung von Mg^{2+} -Ionen über eine Konformationsumwandlung des Enzyms. Danach wäre das Enzym ohne Mg^{2+} -Ionen in einer Konformation, in der es DNA nicht binden kann. Erst durch Mg^{2+} -Ionen Anlagerung an noch nicht identifizierte Bereiche des Enzyms wird seine Konformation so verändert, daß DNA gebunden werden kann.

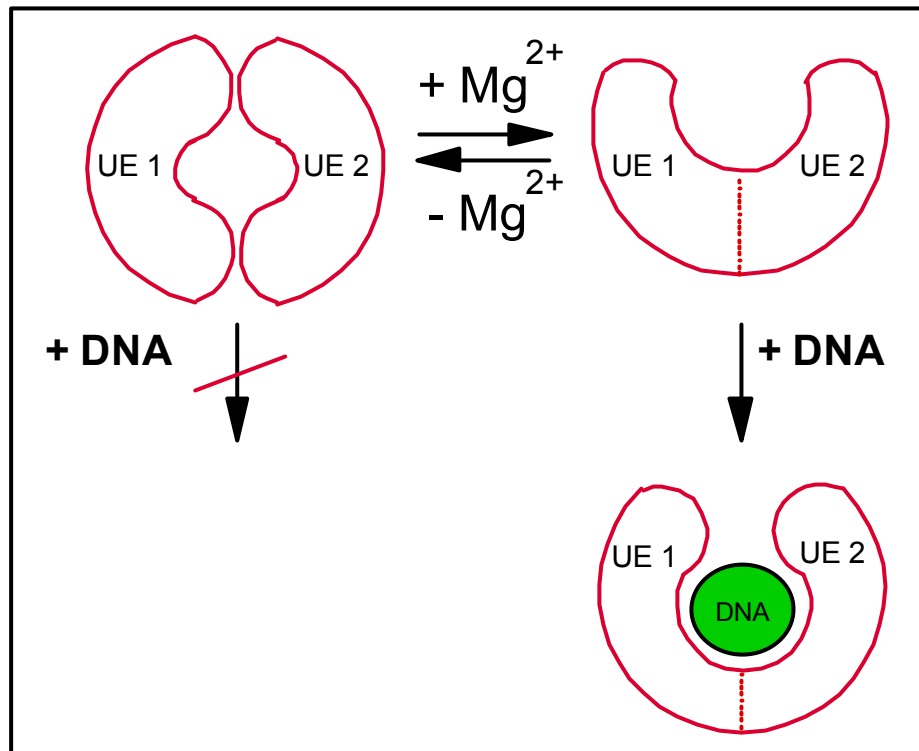


Abb. 27: Schematische Darstellung einer potentiellen Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit von *EcoRI* an DNA von zweiwertigen Kationen.

Daß zweiwertige Kationen, sowie auch DNA einen Einfluß auf die Konformation des Enzyms haben, wurde für das Wildtypenzym in *Stopped flow*-Kinetiken gezeigt. In diesen Experimenten wurde festgestellt, daß in einem Ansatz, in dem das Enzym entweder mit DNA oder mit Mg^{2+} vorinkubiert wurde, die Spaltung bei Zugabe der noch fehlende Komponente schneller erfolgt, als wenn dem Enzym DNA und Mg^{2+} gemeinsam ohne Vorinkubation zugefügt werden [Alves *et al.*, 1989b]. Anscheinend ist dieser für das Wildtypenzym nur angedeutete Effekt für die Mutante K130E soweit verstärkt, daß ohne zweiwertige Kationen keine Bindung erfolgt. Eine solche Konformationsbeeinflussung würde auch erklären, warum Mutationen an unterschiedlichen Stellen im Enzym denselben Effekt zeigen. Ein labiles konformationelles Gleichgewicht kann sicherlich an vielen Stellen im Enzym gestört werden. Besonders empfindlich scheint der Bereich in der Nähe der Position 130 zu sein, da auch Mutanten des *Extended Chain*-Motivs eine DNA-Bindung nur nach Zugabe von Ca^{2+} -Ionen in den Bindungsansatz zeigen [Küster, 1998].

Dieses für *EcoRI*-Mutanten eher ungewöhnliche Verhalten ist für die *EcoRV*-Endonuklease normal. Es wurde zwar erst postuliert, daß die für die spezifische

Bindung verantwortliche zweite Kationen-Bindungsstelle auch im katalytischen Zentrum wäre [Vipond *et al.*, 1995], dann konnte aber gezeigt werden, daß eine Tripelmutante aller drei sauren Aminosäuren dort, immer noch zweiwertige Kationen für die sequenzspezifische DNA-Bindung braucht [Jeltsch *et al.*, 1995]. Aus Experimenten mit Thiophosphat-substituierten Oligonukleotiden und Mn^{2+} , das stärker an Schwefel als an Sauerstoff bindet, wurde geschlossen, daß eine Bindungsstelle für ein zweiwertiges Kation direkt an der DNA liegt, die eine gute Kandidatin für die bindungsvermittelnde Kationen-Bindungsstelle ist. Für die *EcoRI* gibt es keine Hinweise auf eine solche Bindungsstelle.

Um für *EcoRI* nachzuweisen, an welchen Positionen zweiwertige Kationen angelagert werden, die das Enzym in eine bindungsaktive Konformation zu bringen, werden Kokristallstrukturen ohne DNA jeweils mit sowie ohne Mg^{2+} -Ionen im Vergleich benötigt. Da das Enzym durch die Kristallisation möglicherweise aus seiner nativen Konformation herausgedrängt wird, kann allerdings ein Nachweis solcher Bindungsstellen erschwert oder verhindert werden. Da diese Untersuchungen außerdem aufwendig sind, soll demnächst mit Elektronenspinresonanzuntersuchungen (ESR) und paramagnetischen Mn^{2+} -Ionen versucht werden, die Kationen-Bindungsstellen im Enzym zu lokalisieren.

4.1.2 Untersuchung eines Phosphatkontaktes an der Position Lys117

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Position Lys117. Wie die Abbildung 28 zeigt, befindet sich der Lysinrest in der Nähe der Phosphatgruppe zwischen dem Adenin und Thymin in der Mitte der *EcoRI*-Erkennungssequenz.

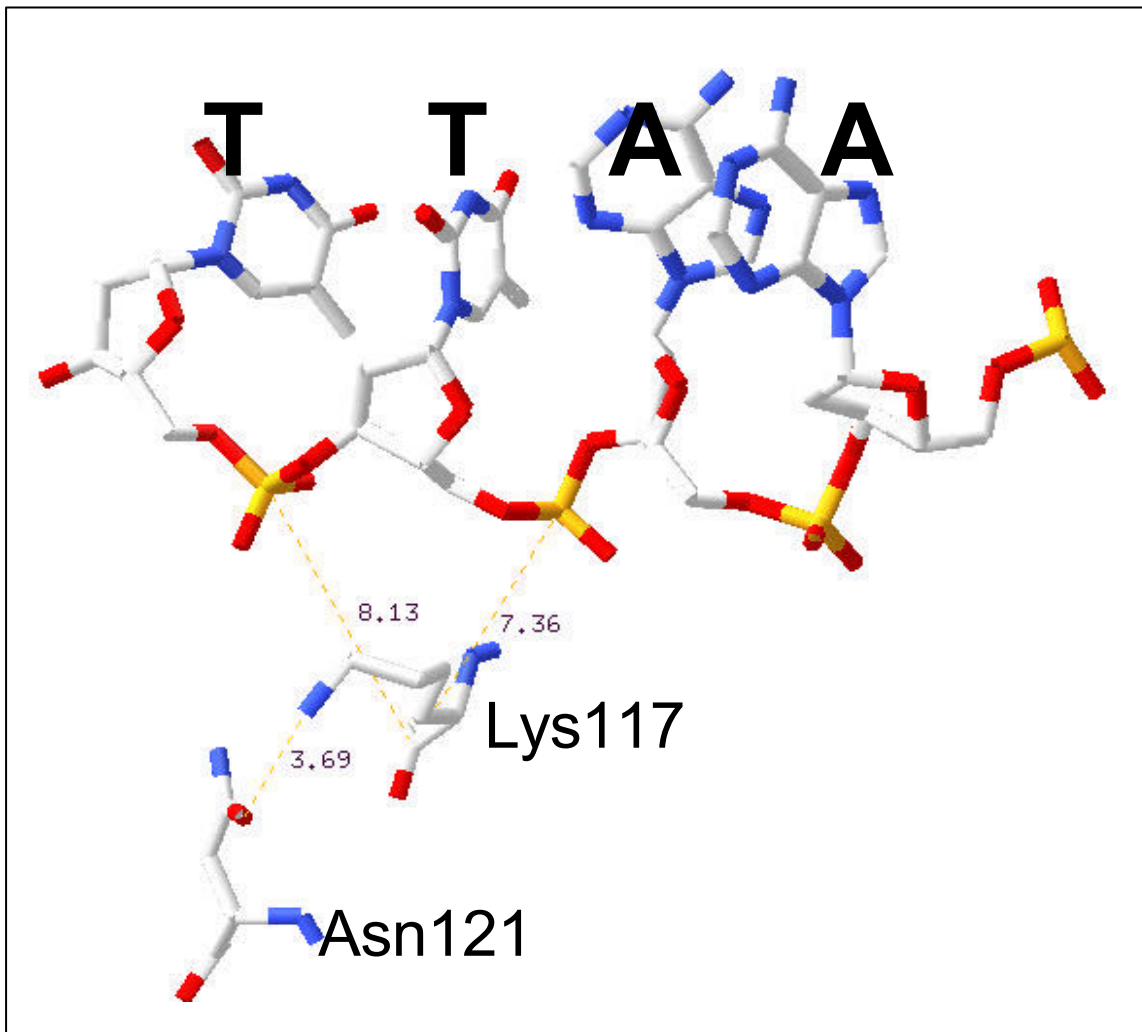


Abb. 28: Positionen der Aminosäuren Lys117 und Asn121 im Kontext der Erkennungssequenz (die Zahlen geben Abstände in Å an).

Es ist sehr deutlich zu sehen, daß der Aminosäurerest an dieser Position nicht zur Phosphatgruppe ausgerichtet ist, sondern zum Asn 121, Ladungen wirken jedoch nach dem Coulomb-Gesetz abhängig von der sechsten Potenz des Radius durch den Raum. Deshalb findet man häufiger für Kristall-Strukturen DNA-bindender Proteine, daß Lysine zwischen zwei Phosphaten positioniert sind, wo die größte negative Ladungsdichte ist. Es ist aber oft nicht auszuschließen, daß diese Position den Mittelwert zwischen verschiedenen Stellungen im Kristall darstellt.

Über zielgerichtete Mutagenese wurde das Lysin gegen Glutamat und Aspartat mit der entgegengesetzten Ladung, gegen Glutamin mit einer polaren Seitenkette und gegen die hydrophoben Aminosäuren Alanin als kleiner Platzhalter und Leucin mit der Fähigkeit, hydrophobe Wechselwirkungen auszubilden, ausgetauscht. Alle Mutanten haben eine mit dem Wildtypenzym vergleichbare Sekundärstruktur gezeigt. Die Spaltaktivität gegenüber dem Wildtyp ist für die Mutanten K117E und K117Q 10fach verringert und liegt für die Mutanten K117A, K117D und K117L um den Faktor 10^4 unterhalb des Wildtyp-Niveaus. Betrachtet man die spezifischen Aktivitäten von K117A, K117D und K117L so deutet der starke Aktivitätsverlust darauf hin, daß diese Position Bedeutsamkeit für *EcoRI* besitzt. Die nicht zu bestimmenden Bindungskonstanten der Mutanten K117D und K117L bestätigen scheinbar diese Annahme. Allerdings ist die Bindungskonstante von K117A nur 10fach niedriger als jene für das Wildtypenzym, was für den Austausch von einer an dem *Indirect readout* mitbeteiligten Position zu hoch erscheint. Die Spaltaktivitäten der Mutanten K117E und K117Q, die nur 10fach unter dem Wildtyp-Niveau liegen, widersprechen ebenfalls der Vermutung, daß die Position 117 von großer Bedeutung für das Enzym ist, und lassen im Falle von K117E die Frage aufkommen, warum eine negativ geladene Aminosäure eine positiv geladene in unmittelbarer Nähe der DNA ersetzen kann, ohne daß ein großer Aktivitätsverlust zu vermerken ist.

Die Bindungskonstante von K117E, die 4fach höher ist als die des Wildtypenzyms ist noch weniger zu erwarten gewesen, da sich negative Ladungen abstoßen und so die Bindung geschwächt werden sollte. Eine mögliche Erklärung für diese gute Spalt- und Bindungsaktivität ist, daß der Glutamatrest an der Position 117 ein zweiwertiges Kation koordiniert und so die Aminosäure Lysin imitiert (Abb. 29). Da die Bindung aber ohne zweiwertige Kationen detektierbar war, würde direkt folgen, daß die zwischen dem Glutamat und dem Phosphat gebildete Bindungstasche eine sehr hohe Affinität für zweiwertige Kationen hätte und deshalb in das Experiment durch die in einer PCR hergestellte DNA eingeschleppte Kationen zu rekrutieren vermag.

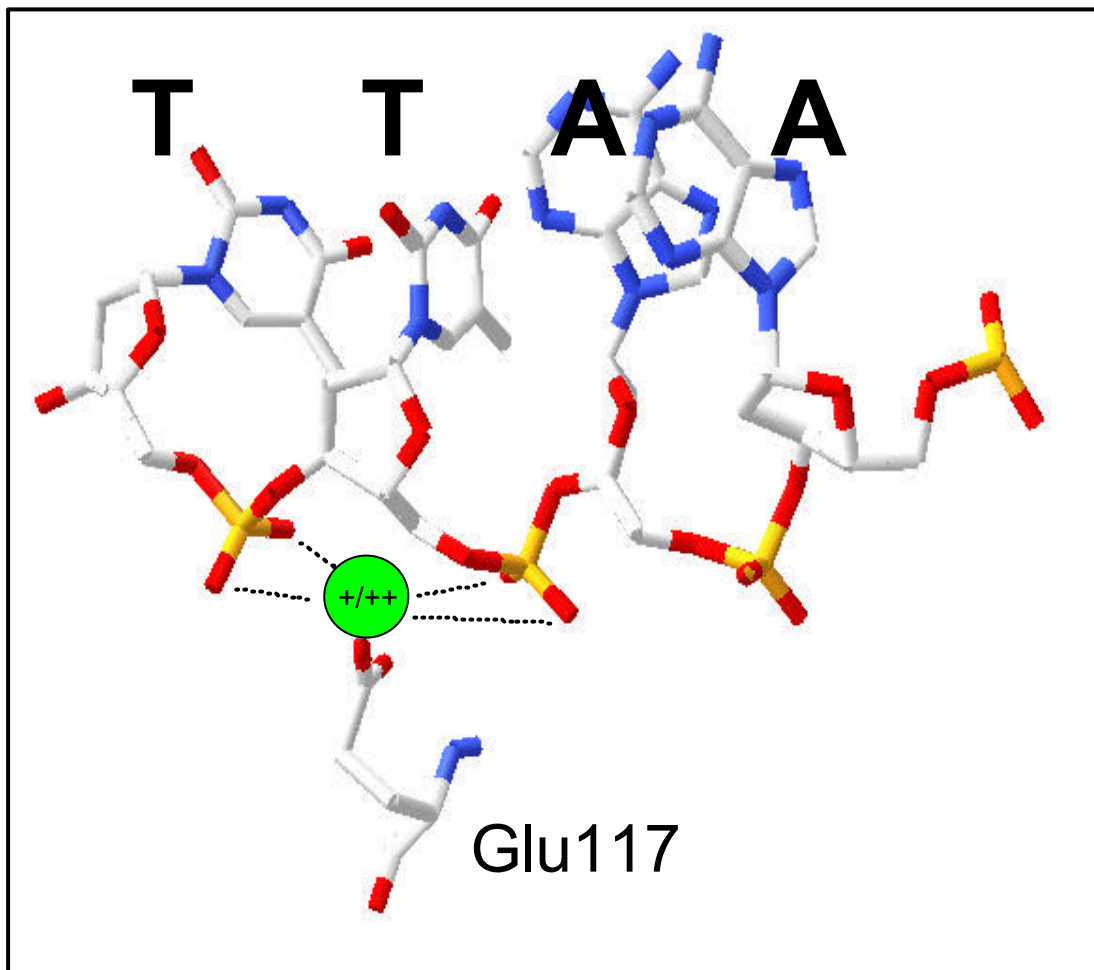


Abb. 29: Schematische Darstellung einer potentiellen Koordination eines ein- oder zweiwertigen Kations durch den Glutamatrest an Position 117. Der Aminosäureaustausch an der Position 117 wurde mit dem Programm Swiss PDB-View simuliert, ohne die Umgebung zu verändern.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein DNA-Bindungsexperiment mit einem *Shift*substrat durchgeführt, das in Gegenwart gesättigter Mengen an EDTA mehrfach aufgereinigt worden war. Im Bindungstest mit der Mutante K117E wurde dieses Substrat mit dem unaufgereinigten 174Bp-*Shift*oligonukleotid verglichen. Dabei nimmt die Bindungskonstante unter Verwendung des aufgereinigten *Shift*substrates etwa 3,5fach zu. Folglich ist die Positionierung eines zweiwertigen Kations über das Glutamat an Position 117 für die Mutante K117E auszuschließen, da eine Beseitigung der Ionen zu einem verminderten Bindungsverhalten führen sollte.

Eine zweite Hypothese, die das unerwartete Spalt- und Bindungsverhalten von K117E erklären könnte, ist die Positionierung eines einwertigen Kations durch den genannten Glutamatrest 117. Monovalente Kationen zu komplexieren und die DNA von ihnen zu befreien, ist nicht möglich, da die DNA diese benötigt, um die

anionischen Phosphatgruppen voneinander abzuschirmen. Um eine potentielle Wechselwirkung, an der einwertige Kationen beteiligt sind, nachzuweisen, wurden die Natrium-Ionen, die normalerweise für die Abschirmung verantwortlich sind, gegen Kalium- oder Rubidium-Ionen ausgetauscht. Dazu wurde das Enzym gegen einen *EcoRI*-Aufbewahrungspuffer dialysiert, der das jeweilige andere Kation enthält. Das Natrium-Ion ist mit einem Radius von 99Å das kleinste geladene Teilchen dieser Reihe, gefolgt vom Kalium-Ion mit 138Å und dem Rubidium-Ion mit 152Å. In dem Fall, daß ein einwertiges Kation von dem Glutamatrest an Position 117 koordiniert würde, könnte der unterschiedliche Raumbedarf der Kationen einen Einfluß auf die Bindungs- und auch Spaltaktivität der Mutante K117E haben. Es wurden mit diesen dialysierten Enzymfraktionen, im Vergleich zu entsprechend umgepuffertem Wildtypenzym, Spaltkinetiken auf λ -DNA angefertigt. Anhand der Spaltmuster der Kinetiken wurde deutlich, daß sowohl das Wildtypenzym, als auch die Mutante K117E mit allen monovalenten Kationen gleich gut spalten. Hiermit liegt ein weiterer Hinweis darauf vor, daß kein positiv geladenes Ion von dem Glutamatrest an Position 117 positioniert wird, wobei dies aber weiterhin auch nicht auszuschließen ist.

Um zu untersuchen, inwieweit die Ladung oder Größe des Aminosäurerestes einen Einfluß auf das Bindungs- und Spaltverhalten der K117-Mutanten hat, wurden die Mutanten K117Q und K117D angefertigt. Das Aspartat ist um eine CH₂-Gruppe kürzer als das Glutamat, weist aber ähnliche Eigenschaften der Carboxylgruppe auf. Die β -Carboxyl-Gruppe des Aspartats besitzt einen pK-Wert von 3,90, im Vergleich zu einem pK-Wert von 4,07 für die γ -Carboxyl-Gruppe des Glutamates [Dawson *et al.*, 1969]. Das Glutamin ist von sehr ähnlicher Struktur wie das Glutamat, es trägt allerdings keine negative Ladung, sondern bietet eine Amidfunktion mit guter Wasserstoffbrückenbindungskapazität. So wird mit der Mutante K117Q die Möglichkeit geschaffen, über ihre Seitenkette Kontakte mit der DNA auszubilden, was auch in einer Simulation mit dem Programm Swiss PDB-View, in dem der Rest Lys117 ausgehend von der *EcoRI*-Kristall-Struktur zu einem Glutamin mutiert wurde, sichtbar ist (Abb. 30).

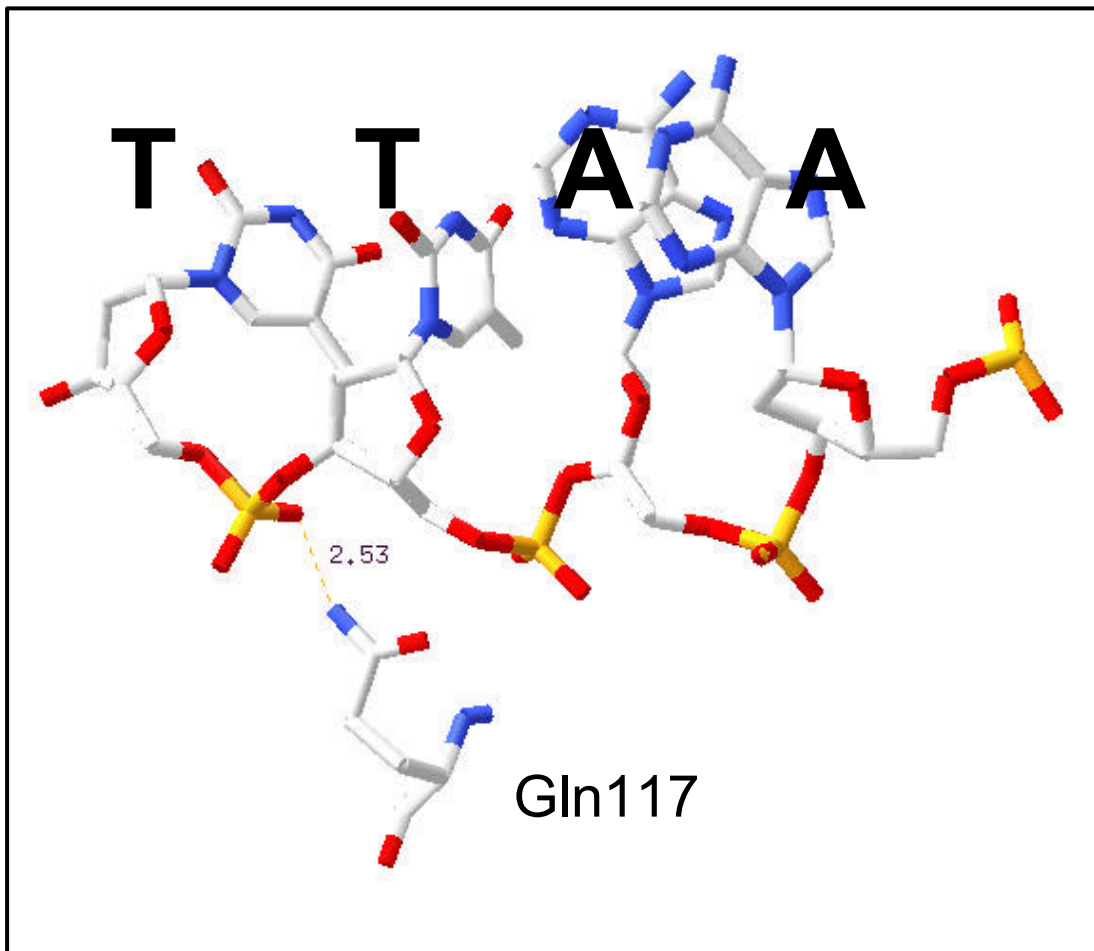


Abb. 30: Schematische Darstellung eines potentiellen Kontaktes durch den Glutaminrest an Position 117 mit dem Phosphat zwischen den beiden Thyminbasen. Die Mutation der Position Lys117 zu einem Glutamat wurde mit dem Programm Swiss PDB-View simuliert.

Laut der ermittelten Ausrichtung des Glutaminrestes ist dieser allerdings näher an der Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Thyminbasen lokalisiert, als zwischen dem Adenin und Thymin. Über die Aminogruppe der Seitenkette hat die Mutante die Möglichkeit eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem freien Sauerstoffatom in 0,25nm Entfernung einzugehen (Abb. 30).

Die Mutante K117D hat eine sehr geringe spezifische Aktivität und eine nicht detektierbare Bindungskonstante und zeigt damit ein ähnliches Verhalten wie die Mutanten K117A und K117L. Dieses Ergebnis schwächt die Hypothese, daß die Mutante K117E ihre Bindungsfähigkeit und Aktivität durch die Koordination eines positiv geladenen Ions aufrecht erhält, weiter ab, da auch das Aspartat in der Lage wäre, ein solches Ion zu positionieren, und aufgrund der Wirkung von Ladungen durch den Raum mehr Spalt- und Bindungsaktivität haben sollte als die Alanin- und Leucin-Mutanten.

Die spezifische Aktivität von K117Q befindet sich, trotz einer etwa 10fach geringeren Bindungskonstante, auf gleicher Höhe wie K117E. Für die Mutante K117Q könnte die hohe spezifische Aktivität, sowie die mittlere Bindungskonstante durch die bereits beschriebene Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphat zwischen den beiden Thyminbasen erklärt werden. Für die Mutante K117E ist eine ähnliche Erklärung allerdings nur unter der Annahme zu treffen, daß die γ -Carboxylgruppe protoniert ist, was bei einem pK-Wert von 4,09 für die Gruppe und einem pH-Wert von 7,5 unter den experimentellen Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist. Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob der Glutamatrest vom Lösungsmittel abgeschirmt an der Protein-DNA-Interaktionsfläche protoniert vorliegt, wurden Spaltkinetiken auf λ -DNA bei einem pH-Wert von 8,8 durchgeführt. Das Wildtypenzym spaltet unter diesen Bedingungen etwa gleich gut wie unter Standardbedingungen. Gleiches gilt für K117Q, während K117E unter den gewählten Bedingungen sogar 2fach aktiver ist. K117D zeigt auch unter diesen Bedingungen keine Aktivität. Somit ist die Annahme, daß die Carboxyl-Gruppe der Glutamatseitenkette im Enzym protoniert ist, sehr unwahrscheinlich, da eine Steigerung des pH-Wertes die Deprotonierung fördern würde, und nachfolgend die Bindungs- und Spaltaktivität des Enzyms sinken müßte.

Zusammenfassend hat die Untersuchung des potentiellen Phosphatkontaktes K117 folgende Ergebnisse geliefert:

- Ein Austausch von Lys117 gegen einen kleinen ungeladenen Rest (Alanin), gegen einen großen hydrophoben Rest (Leucin) und gegen einen kürzeren geladenen Rest (Aspartat) führt zu einem relativ inaktiven Enzym.
- Der Austausch gegen eine große geladene Aminosäure (Glutamat) oder eine große Aminosäure mit einer ungeladenen polaren Seitenketten (Glutamin) führt nur zu einer 10fach verringerten Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym.
- Die Mutante K117E bewahrt ihre Aktivität nicht durch die Positionierung eines ein oder zweiwertigen Kations.
- Der Glutamatrest an Position 117 ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht protoniert.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß von der Position 117 kein ionischer Kontakt zum Phosphatrückgrat der DNA gebildet wird, sondern daß diese Position eine eher raumausfüllende Funktion ausübt und mit einem hydrophilen Rest besetzt sein sollte. Im Zuge der hydrophilen Raumauffüllung besteht die Möglichkeit,

daß wasservermittelte Kontakte zwischen der Carboxyl- bzw. Amidgruppe von Glutamat oder Glutamin und dem Phosphatrückgrat gebildet werden (Abb. 31).

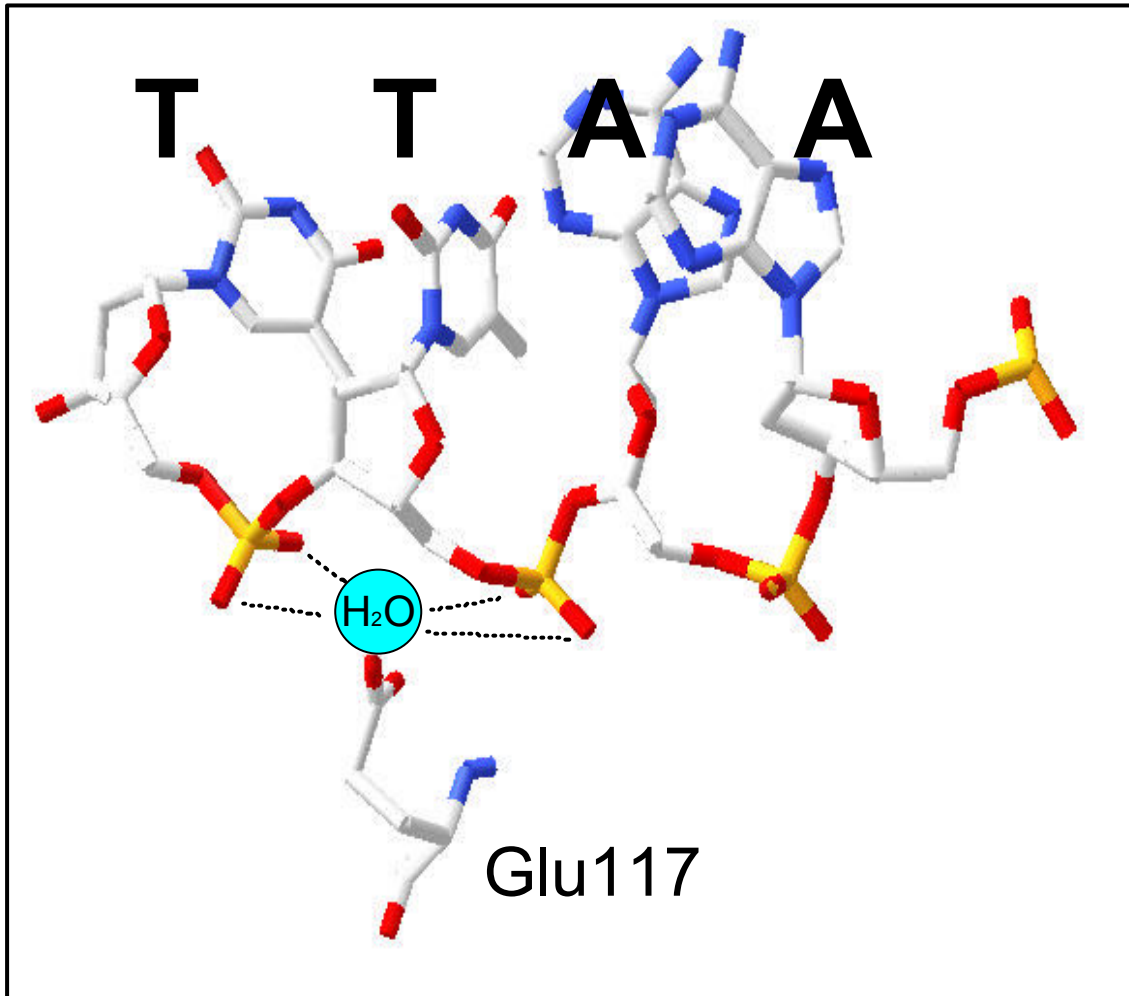


Abb. 31: Schematische Darstellung von wasservermittelten Kontakten zwischen dem Glutamat an Position 117 und dem Phosphatrückgrat. Die Mutation der Position Lys117 zu einem Glutamat wurde mit dem Programm Swiss PDB-View simuliert.

Die Ergebnisse können aber auch durch negative Einflüsse auf benachbarte Kontakte überlagert sein. So steht direkt vor dem Lys117 das Gly116, das über sein Peptid-NH eine Wasserstoffbrücke mit dem vom 117 weggewandten Sauerstoff der Phosphatgruppe zwischen dem Adenin und dem Thymin ausbildet (Abb.32). Dieser Kontakt wurde für die Ausbildung eines zentralen Knicks (*Kink*) in der Erkennungssequenz als wichtig erachtet [Kurpiewski *et al.*, 1996]. Zum Beispiel durch Verlagerung des hydrophoben Leucins mehr zum Inneren des Proteins könnte er gestört werden. Noch weiter vorne in der Aminosäuresequenz stehen noch ein Basenkontakt (Gln115), der eine wichtige Rolle in der Kopplung von Erkennung und Katalyse spielt [Jeltsch *et al.*, 1993], ein weiterer Phosphatkontakt (His114) [Flores *et*

al., 1995] und das katalytische Zentrum (Lys113, Glu111) [Grabowski *et al.*, 1995]. Somit sind deutliche Effekte auf die Katalyse, wie sie bei der bindungsaktiven und spaltinaktiven Mutante K117A auftreten, leicht zu erklären. Um so erstaunlicher bleibt die hohe Aktivität der K117E-Mutante.

4.1.3 Spalt- und Bindungsverhalten von wtEcoRI mit Methylphosphonat-Substraten

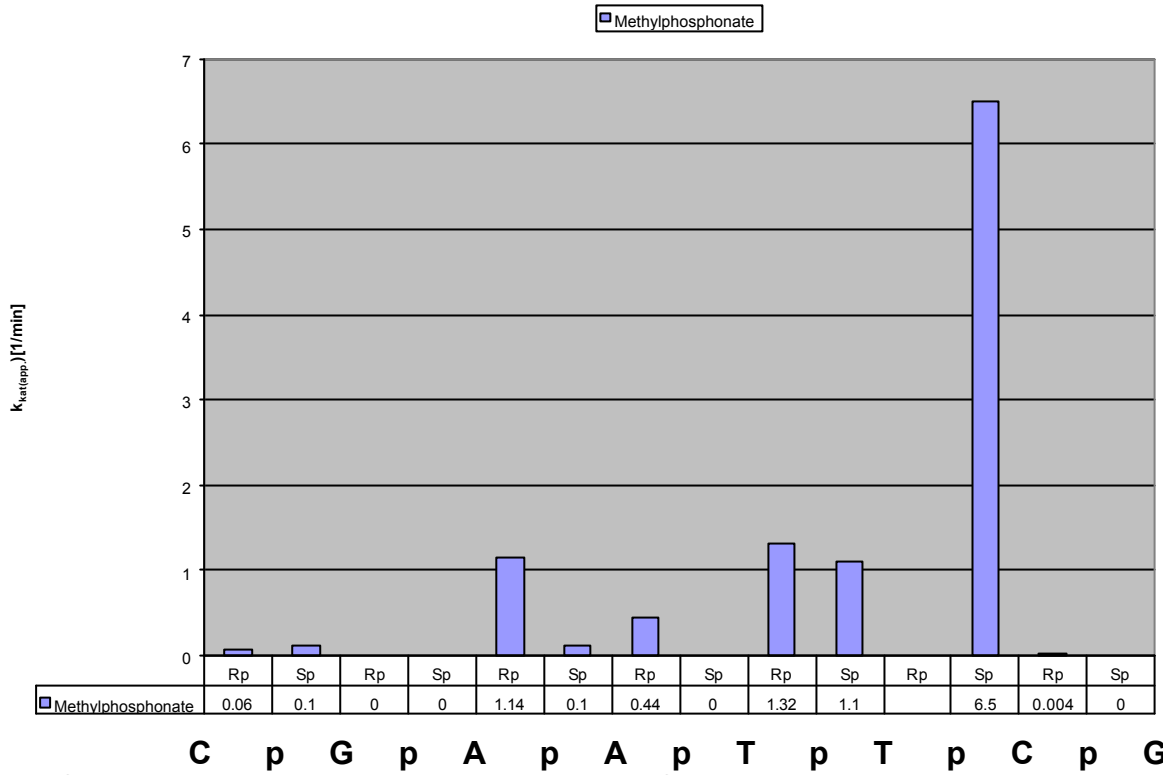
Ein effizientes Mittel, um die Bedeutsamkeit von einzelnen Phosphatkontakten für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* zu untersuchen, ist die Charakterisierung des Spalt- und Bindungsverhaltens des Enzyms mit modifizierten Oligonukleotiden als Substrat. Hierzu wurden in dieser Arbeit dodekamere Methylphosphonate, in denen die freien Sauerstoffatome der Phosphatgruppen innerhalb und flankierend zur Erkennungssequenz durch eine Methylgruppe in R- oder S-Konfiguration ersetzt sind, verwendet. Der Austausch eines Sauerstoffatoms gegen eine Methylgruppe, hat eine Ladungsentfernung zur Folge und bildet weiterhin zusätzlich ein kleines sterisches Hindernis. Außerdem gibt die Trennung der in R- und S-Konfiguration vorliegenden Methylphosphonate die Möglichkeit stereoselektiv direkte Kontakte zu untersuchen.

Im Vergleich zu dem unmodifizierten Kontrolloligonukleotid zeigen alle Umsatzraten und Bindungskonstanten der Methylphosphonate eine deutliche Aktivitätsabnahme. Bei den Bindungskonstanten beträgt sie wenigstens 2 Größenordnungen. Ein Problem, das bei der Bestimmung der Bindungskonstanten auftrat, ist, daß das Kontrolloligonukleotid schon vergleichsweise schlecht gebunden wird. Ähnlich lange Oligonukleotide binden bis zu 1000fach besser [Alves *et al.*, 1989a]. Allerdings ist die Bindung deutlich durch die Seitensequenzen neben der Erkennungssequenz moduliert [Jen-Jacobsen, 1997]. Auch die Meßmethode mag hier einen Einfluß haben, obwohl ich zumindest mit längeren Substraten im Gelshift auch Bindungskonstanten um 10^8 M^{-1} gemessen habe (3.1.1.4). Sehr schwache Bindungskonstanten waren nicht meßbar, da das Enzym aufgrund zu hoher Konzentrationen im Bindungsansatz ausgefallen war, weshalb in diesen Fällen nur eine Bindungskonstante von $<10^4$ abgeschätzt werden konnte. Weiterhin ist die Größe der Bindungskonstanten im allgemeinen nicht konform mit der katalytischen

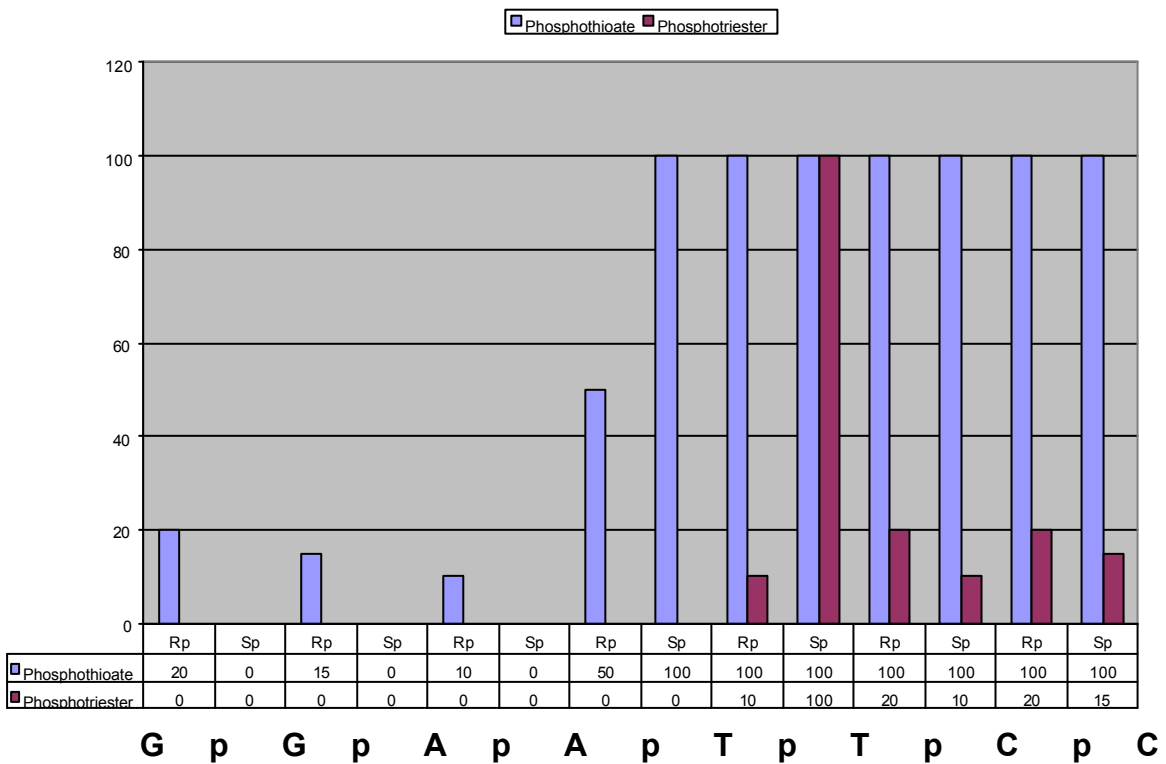
Aktivität. So ist z.B. für das am besten spaltbare Oligonukleotid TC-S keine Bindungsstärke detektierbar, während das nicht spaltbare Methylphosphonat GA-R die höchste gemessene Bindungskonstante der modifizierten Substrate zeigt. Der Bindungstest ist somit unempfindlicher als die Aktivitätsbestimmung und differenziert im wesentlichen zwischen einer guten Bindung des Kontrolloligonukleotids und einer wenigstens 100fach schlechteren Bindung der Methylphosphonate. Daraus kann die generelle Aussage getroffen werden, daß jede methylierte Position das Bindungsverhalten des Enzyms stört, ohne zwischen sterischer Hinderung oder einer fehlenden Ladung differenzieren zu können. Es ist aber auch nicht von der Hand zu weisen, daß die Substitution mit Methylphosphonaten auch einen Einfluß auf die Stellung der Basen haben kann. Da die Basenerkennung aber in der *EcoRI* sehr stark untereinander vernetzt und an die Spaltaktivität gekoppelt ist, kann das die Ursache für eine allgemeine Reduktion der Bindungsstärke und auch der Spaltaktivität sein

Aus den katalytischen Daten kann eine genauere Information über die Bedeutsamkeit von Kontakten zu einzelnen Positionen für das Wildtypenzym gewonnen werden, als aus den Bindungsdaten (Diag.1).

Es gibt einige Positionen im Phosphatrückgrat, an denen eine Ladungsentfernung oder sterische Behinderung dazu führt, daß keine Spaltaktivität des Enzyms mit diesen Substraten vorhanden ist. Dazu gehören die Positionen GA-R, GA-S, CG2-R und CG2-S. Zwischen dem Guanin und dem Adenin handelt es sich um das Phosphat, an dem die Spaltung durch das Enzym erfolgt. Dazu wird das Mg^{2+} -Ion am pro-S-Sauerstoff koordiniert und das Lys113 bindet an dem pro-R-Sauerstoff zur Neutralisierung des Übergangszustands. Somit war zu erwarten, daß eine Modifizierung an dieser Stelle die Katalyse stark einschränkt oder verhindert. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die Spaltuntersuchungen mit an dieser Position modifizierten Phosphotriestern bestätigt [Koziolkiewicz and Stec, 1992], die nicht spaltbar waren (Diag. 2). Gleiche Untersuchungen mit Phosphothioaten zeigen, daß eine Substitution gegen Schwefel in R-Konfiguration noch eine Bindung von Lys113 und damit eine 15%ige Spaltaktivität des Enzyms erlaubt, während die S-Konfiguration die notwendige Koordination des Mg^{2+} -Ions verhindert.



Diag. 1: Spaltkinetiken von wtEcoRI mit Methylphosphonat-Substraten



Diag. 2: Spaltkinetiken von wtEcoRI mit Phosphothioat- und Phosphotriester-Substraten [Koziolkiewicz & Stech, 1992]

Dem Phosphat zwischen dem Cytosin und der flankierenden Base der Erkennungssequenz steht Lys130 gegenüber. Das Peptid-NH dieser Aminosäure ist fast in Wasserstoffbrückenabstand ($3,4\text{\AA}$), sodaß ein Kontakt nach leichter Umorientierung möglich erscheint. Außerdem steht die Seitenkette leicht zurückgewandt zwischen diesem und dem folgenden Phosphat (Abb. 32).

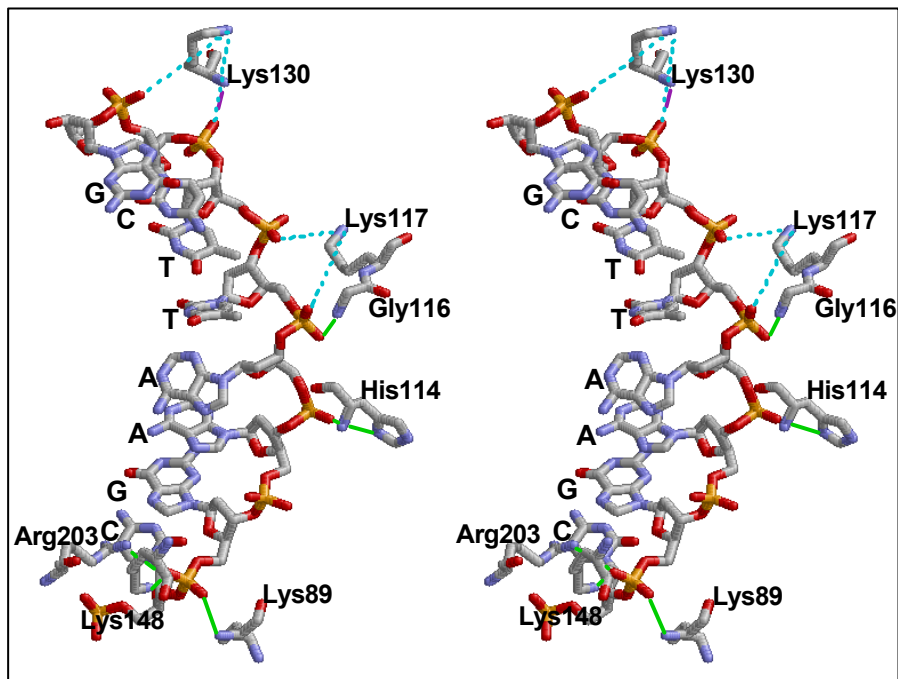


Abb. 32: Stereobild der von *EcoRI* geknüpften Phosphatkontakte. Der violette Kontakt von der Peptidkette des Lys130 ist ebenso nur nach Konformationsumlagerung denkbar, wie Kontakte durch die Seitenketten von Lys117 und Lys130(gestrichelt).

Eine Methylphosphonatsubstitution führt zu einer fast vollständigen Abnahme der Spaltaktivität, CG2-R wird mit einer etwa 10000fach verringerte Restaktivität gespalten, während CG2-S nicht gespalten wird. Da der Austausch des Lysins an Position 130 gegen ein Alanin nur eine etwa 10fach verringerte Spaltaktivität auf λ -DNA gegenüber dem Wildtypenzym zeigt [Windolph *et al.*, 1997b], ist dieser Effekt eher auf die sterische Behinderung durch die Methylgruppe zurückzuführen, als auf die Entfernung der Ladung an dieser Stelle. Die Ergebnisse werden durch die Untersuchungen mit Phosphotriestern und Phosphothioaten untermauert. Eine Substitution gegen Schwefel führt zu keinerlei Abnahme in der Aktivität von *EcoRI*, was zeigt, daß hier kein direkter ionischer Kontakt gestört wird. Dagegen führt der Austausch gegen eine Ethoxy-Gruppe zu einer Abnahme der Spaltaktivität des Enzyms auf 15-20% im Vergleich zur Spaltung des unmodifizierten Substrates, was andeutet, daß an dieser Stelle eine sterische Behinderung erfolgt. Die trotzdem sehr

großen Effekte auf die Spaltaktivität können dadurch mitbeeinflusst sein, daß das Enzym die DNA an dieser Position knickt und Einflüsse der Konformation von Seitensequenzen auf die Spaltaktivität abblocken [Windolph *et al.*, 1997a]. Für die Mutante K130E, die einem deutlich stärkeren Einfluß der Seitensequenzen ausgesetzt ist als das Wildtypenzym, ist eine große Flexibilität dieser Sequenzen für eine effektive Spaltung notwendig. Es besteht die Möglichkeit, daß die Seitensequenzen in den verwendeten Oligonukleotiden, deren Flexibilität nicht sehr hoch ist, die Spaltung negativ beeinflussen, sobald die CG-2 Position aufgrund einer Modifikation im Kontakt zum Enzym gestört ist.

Neben diesen zwei Positionen, deren Modifikationen zu nicht spaltbaren Substraten führen, gibt es Positionen, die durch Substitutionen weitgehend eine Spaltung des Substrates unterbinden, dabei jedoch auch stereoselektive Effekte zeigen. Dazu gehören die Methylphosphonate CG1-R, CG1-S, AA-R, AA-S, AT-R und AT-S. Seitlich zur Erkennungssequenz zwischen der flankierenden Base und dem Guanin zeigt *EcoRI* eine 300fach geringere Spaltaktivität auf den modifizierten Substraten CG1-R und CG1-S. Für diese Position ist ein Phosphatkontakt zum Peptidrückgrat der Aminosäure 89 und zu den Seitenketten von Lys148 und Arg203 (Abb. 32) postuliert worden [Rosenberg, 1991]. So sind beide Sauerstoffatome in mindestens einer Wasserstoffbrücke gebunden. Eine Substitution gegen Ethoxy-Gruppen führt folgerichtig zu vollständig unspaltbaren Substraten, wogegen das in R-Konfiguration vorliegende Phosphothioat mit einer 20%igen Aktivität und die S-Form gar nicht gespalten wird. Die Wegnahme der Ladung führt also in jedem Fall zu einer sehr starken Aktivitätseinbuße, während ihre Lokalisation am Schwefel in R-Konfiguration an dem die positiv geladenen Aminosäuren Lys148 und Arg203 durch Wasserstoffbrücken gebunden sind, noch teilweise toleriert wird.

Die Phosphatgruppe zwischen den beiden Adenin-Basen ist an der Katalyse durch Abstraktion eines Protons von einem Wassermolekül (1.7) beteiligt. Ein in R-Konfiguration vorliegendes Methylphosphonat an dieser Position wird mit einer 30fach verringerten Rate gegenüber dem unmodifiziertem Substrat gespalten, wogegen das Methylphosphonat in S-Konfiguration 300fach schlechter gespalten wird. Dies Ergebnis erstaunt, da der proR-Sauerstoff an der Katalyse beteiligt ist, was auch von den mit Phosphothioaten erzielten Ergebnissen gestützt wird, wo die R-konfigurierten Substrate mit einer 10%igen Aktivität im Vergleich zum Kontrolloligonukleotid gespalten werden, während die in S-Konfiguration vorliegende

Form nicht gespalten wird (Diag. 2). Die Einführung einer Ethoxygruppe führt in jedem Fall zu einem nicht spaltbaren Substrat (Diag. 2). Somit verhindert nicht die Wegnahme der Ladung per se eine Spaltung, sondern nur eine zusätzliche sterische Behinderung durch eine große Ethoxygruppe, während eine kleine Methylgruppe in S-Konfiguration nur zu einer Reduktion der Katalyse führt. Es war schon für H-Phosphonat-Substitutionen an dieser Position gefunden worden, daß unter alkalischen Bedingungen eine Spaltung erfolgen kann [Jeltsch *et al.*, 1993]. Ein OH^- -Ion ist also in der Lage, ohne Aktivierung direkt die Katalyse einzuleiten. Allerdings muß es dann eine Position in einer Linie zur Phosphodiesterbindung besetzen, die von einer Methylgruppe nur teilweise aber von einer Ethoxygruppe vollständig blockiert wird.

Das Methylphosphonat AT-R wird von *EcoRI* mit 70fach verringerter Aktivität, verglichen mit dem unmodifiziertem Substrat, gespalten, während die S-Form nicht gespalten wird. Eine Substitution gegen Ethoxygruppen führt zu nicht spaltbaren Substraten (Diag. 2), während die Substitution der Sauerstoffatome gegen Schwefel nur in R-Konfiguration eine 2fache Verringerung der Spaltaktivität des Enzyms zur Folge hat (Diag. 2). Das zeigt, daß der für diese Position postulierte Phosphatkontakt zum Peptidrückgrat von Gly116 (Abb. 32) [Kurpiewski *et al.*, 1996], durch sterische Behinderung, sowie Ladungsentfernung stark gestört wird, während eine Substitution gegen Schwefel diesen Kontakt regeneriert. Das ist im Einklang mit der Struktur, nach der der Kontakt zum Peptidrückgrat von dem pro-S-Sauerstoffatom geknüpft wird.

Die am besten spaltbaren Methylphosphonate sind TT-R, TT-S und TC-S. Leider konnte die TC-R-Position aufgrund von Syntheseproblemen noch nicht untersucht werden. Für das Phosphat zwischen den beiden Thyminbasen der *EcoRI*-Erkennungssequenz wurde kein direkter Kontakt postuliert. Die beiden Methylphosphonate dieser Position (TT-R und TT-S) werden mit 30fach geringerer Aktivität im Vergleich zur unmodifizierten Form von *EcoRI* gespalten. Dieses Ergebnis ist nicht vollständig konform mit den Ergebnissen der Phosphotriesterspaltung, wo die R-Form 10fach schlechter spaltbar ist als das Kontrolloligonukleotid, während die S-Form keine Beeinflussung der Spaltung zeigt. Eine Substitution gegen Schwefel bringt ebenfalls keine Beeinflussung der Spaltbarkeit der Substrate mit sich. Gerade auch die Methylphosphonat-Ergebnisse sprächen für eine Umorientierung der Seitenkette des Lys117 zum pro-R-Sauerstoff

entgegen der Konformation der Kristalle. Allerdings lassen auch die Mutageneserergebnisse (4.1.2) einen solchen Kontakt eher fraglich erscheinen. Für die beobachteten Effekte muß deshalb auch eine Beeinträchtigung der Stellung der Basen in Betracht gezogen werden, die intensiv über einen sehr engen Kontakt zum *Extend chain*-Motiv erkannt werden.

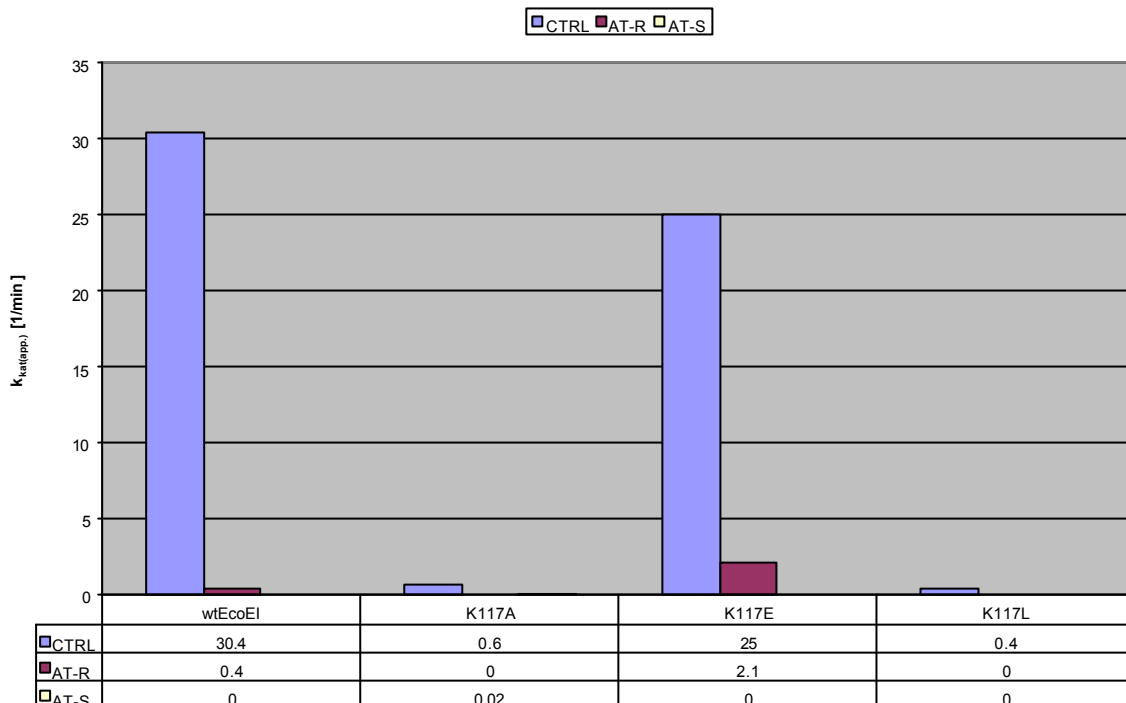
Für das Phosphat zwischen dem Thymin und dem Cytosin ist ebenfalls kein Kontakt postuliert, was sich darin widerspiegelt, daß das Methylphosphonat TC-S das am besten spaltbare modifizierte Substrat ist (Diag. 1) und nur 5fach schlechter als das Kontrolloligonukleotid gespalten wird. Eine Substitution beider Sauerstoffatome gegen Schwefel führt zu keiner Reduzierung der Spaltbarkeit der Substrate, was andeutet, daß kein direkter Kontakt an dieser Position gebildet wird (Diag. 2). Eine große sterische Behinderung, durch Einführung von Ethoxygruppen führt allerdings zu einer 5-10fachen geringeren Spaltaktivität von *EcoRI* auf diesen Oligonukleotiden, was konform mit dem Ergebnis des Methylphosphonates ist (Diag. 2). Dies Ergebnis macht eine Wasserstoffbrücke vom Peptid-NH des Lys130 unwahrscheinlich in Übereinstimmung mit dem zu großen Abstand in der Röntgenstruktur. Allerdings sind sterische Änderungen durch die Ethoxygruppe doch spürbar genauso wie die Wegnahme der Ladung.

Zusammenfassend spiegeln die Ergebnisse der Spaltkinetiken mit Methylphosphonat-Substraten die postulierten Kontakte zwischen Enzym und Erkennungssequenz wider und sind ebenfalls im Einklang mit den Spaltuntersuchungen von *EcoRI* auf Phosphothioaten sowie Phosphotriestern [Koziolkiewicz and Stec, 1992]. Allerdings sind die Daten, die anhand der Methylphosphonatspaltungen gewonnen wurden, spezifischer als die Daten für die letzteren beiden Substrate, da hier Anfangsgeschwindigkeiten und nicht prozentuale Spaltanteile zu fixen Zeitwerten bestimmt wurden.

4.1.4 Spalt- und Bindungsverhalten der K117-Mutanten mit Methylphosphonat-Substraten

Für die Position K117 wurde ein Kontakt zum Phosphat in der Mitte der *EcoRI*-Erkennungssequenz postuliert. Allerdings wurde wie bereits unter 4.1.2 diskutiert bereits ausgeschlossen, daß ein ionischer Kontakt zum Phosphatrückgrat gebildet wird. Im Zuge der Untersuchung der Mutanten K117A, K117E und K117L wurden

auch Spaltkinetiken und Bindungstests mit den modifizierten Oligonukleotiden AT-R und AT-S durchgeführt (Diag. 3).



Diag. 3: Spaltkinetiken der Mutanten K117A, K117E und K117L mit den Methylphosphonaten AT-R und AT-S.

Die Spaltaktivitäten der K117-Mutanten auf dem Kontrolloligonukleotid (CTRL) spiegeln die Aktivitäten der Enzyme auf λ -DNA wider (3.1.2.3). K117A und K117L sind fast inaktiv, während die Mutante K117E nur geringfügig weniger aktiv ist als das Wildtypenzym. Die Mutante K117A zeigt als einziges untersuchtes Enzym Spaltaktivität auf dem AT-S-Substrat. Somit scheint die Alaninsubstitution den Kontakt der Nachbarposition 116 so zu beeinflussen, daß das AT-S Substrat spaltbar ist, wogegen das, von Wildtyp-*EcoRI* und K117E bevorzugte AT-R-Substrat nicht gespalten wird. Die Mutante K117E spaltet das AT-R-Substrat 5fach besser als das Wildtypenzym, was daran liegen könnte, daß der Glutamatrest die Phosphatrückgrat kontaktierende Position 116 besser positioniert, oder daß unterstützende, wasservermittelte Kontakte zwischen dem Aminosäurerest und der DNA in diesem Fall eine bessere Bindung und anschließende Spaltung ermöglichen als das Lysin im Wildtypenzym.

4.2. Erweiterung der Spezifität von *EcoRI*

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der Erweiterung der Spezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*. Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese des *ecoRI*-Gens soll ein Enzym generiert werden, daß eine nach außen um je eine Base erweiterte Erkennungssequenz bindet und spaltet. Das Ziel ist das Design eines Restriktionsenzym mit einer definierten Oktanukleotid-Erkennungssequenz. Solche Enzyme sind von Natur aus selten, da für das Auftreten einer Oktanukleotid-Erkennungssequenz eine geringe statistische Wahrscheinlichkeit vorliegt (1 : 65535) und sie deshalb wenig effektiv in einer Restriktion von Phagen erscheinen. Sie versprechen aber großen Nutzen bei der Bearbeitung großer DNA-Fragmente.

Der erste Schritt war die Auswahl der am besten geeigneten Mutagenese position, anhand der Kokristall-Struktur. Der geeignetste Aminosäurerest ist das Ile197, der oberhalb der großen Grube am Randbereich der Erkennungssequenz liegt. Dieser Rest sollte eigentlich einen hydrophoben Kontakt zum Cytosin der Erkennungssequenz herstellen, was jedoch durch die Arbeit von Herrn Dr. Wolfgang Küster [Küster, 1998] widerlegt werden konnte. Wie Abbildung. 33 zeigt, ist die Wahl der Position nicht optimal, da der Abstand zwischen dem Isoleucin und der ersten Base außerhalb der Erkennungssequenz relativ groß und die zweite Base außerhalb der Erkennungssequenz sogar in besserer Reichweite ist. Es gibt aber keinen weiteren Aminosäurerest, der vergleichbar gut oberhalb der großen Grube steht und nicht schon an DNA-Kontakten beteiligt wäre.

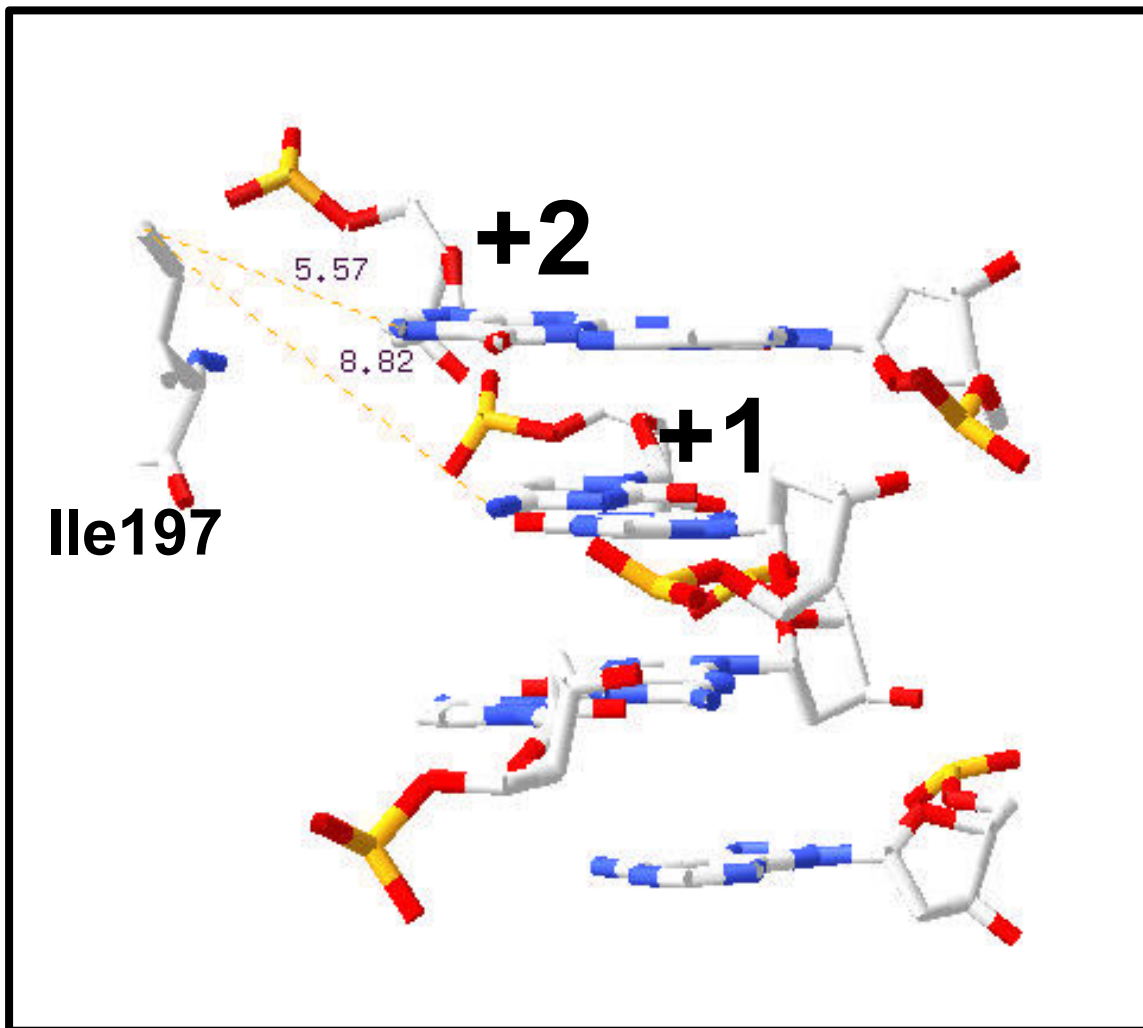


Abb. 33: Position des Aminosäurerestes Ile197 in Bezug auf das erste (+1) und zweite (+2) Basenpaar außerhalb der *EcoRI*-Erkennungssequenz.

Um neue Kontaktmöglichkeiten an Position 197 zu generieren wurden drei gezielte Aminosäureaustausche gegen Arginin, Glutamat und Glutamin untersucht. Alle Reste sind in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden und sind länger als das Ile197. Die Mutanten I197R und I197Q zeigen das Standard-Spaltmuster von *EcoRI* auf dem Substrat λ -DNA. Die spezifischen Aktivitäten und Bindungskonstanten befinden sich auf dem Niveau des Wildtypenzym. Die Mutante I197E zeigt eine erhöhte Selektivität und spaltet die B- und D-Spaltstellen langsamer als die anderen Spaltstellen auf λ -DNA, besitzt dabei allerdings insgesamt eine relativ geringe Spalt- und Bindungsaktivität. An diesem Ergebnis wurde deutlich, daß es nicht genügt, dem Enzym einfach außerhalb seiner Erkennungssequenz neue Kontakte anzubieten, um seine Spezifität zu verändern.

Deshalb wurde im folgenden versucht, das Enzym in der Erkennung seiner Basensequenz zu schwächen und gleichzeitig neue Kontakte anzubieten. Dazu wurde die Mutante A142G, die im *Extended chain*-Motiv von *EcoRI* lokalisiert ist und eine geringe Aktivität bei nur geringfügig erniedrigter Bindungskonstante zeigt [Küster, 1998], mit den Mutanten I197E, I197Q und I197R kombiniert und die Doppelmutanten A142G/I197E, A142G/I197Q und A142G/I197R hergestellt. Alle Mutanten zeigen eine geringe Spaltaktivität bei mittlerer Bindungsstärke und einem uneingeschränkten *EcoRI*-Spaltpattern auf λ -DNA. In diesen Mutanten überwiegen eindeutig die Charakteristika der Einzelmutante A142G. Das zeigt deutlich, daß sich die Eigenschaften von Einzelmutanten in Doppelmutanten nicht einfach additiv kombinieren lassen.

Mit Hilfe einer Simulation mit dem Programm Swiss PDB-View kann eine Ausrichtung der Aminosäurenreste an Position 197 in die große Grube hinein modelliert werden (Abb. 33). Jedoch zeigt der Ile197-Rest anhand der Kokristall-Struktur [Rosenberg, 1991] nicht direkt in die große Grube hinein, was möglicherweise bedeutet, daß auch die ausgetauschten Positionen an dieser Stelle nicht in die Nähe der DNA gelangen, um dort neue Kontakte zu knüpfen. Um eine Ausrichtung der Aminosäurereste in die große Grube an dieser Stelle zu unterstützen, wurde versucht, diese Position in ein Wasserstoffbrückenbindungsnetz einzubinden. Abbildung 21 (Seite 73) zeigt ein modelliertes Netzwerk zwischen der ebenfalls mutierten Position A138N mit I197Q und den Basen der Erkennungssequenz. Im Zuge der Ausbildung dieses Netzwerkes wurden die Mutanten A138D/I197Q und A138N/I197Q hergestellt und charakterisiert. Anhand der Spalt- und Bindungseigenschaften der beiden Doppelmutanten läßt sich allerdings keine Ausrichtung der Position 197 in die große Grube nachweisen. Beide Mutanten zeigen nach wie vor das typische *EcoRI*-Spaltpattern auf λ -DNA, bei leicht verringerter Aktivität.

Die Einzelmutante M137Q zeigt eine relaxierte Spezifität für ihre Erkennungssequenz [Küster, 1998] und ist in der Lage, Kontakt zu einer Erkennungssequenz auszubilden, in der das Cytosin gegen ein Thymin ausgetauscht wurde. Diese Mutante zeigt, daß die normalerweise redundante Sequenzerkennung der *EcoRI* veränderbar ist. Diese Variabilität in der Basenerkennung innerhalb der Erkennungssequenz ist möglicherweise ein guter Ausgangspunkt, um außerhalb der Erkennungssequenz neue Kontakte anzubieten. Weiterhin läßt sich der Austausch des Methionins an

Position 137 gegen ein Glutamin gut mit dem bereits beschriebenen Netzwerk der Positionen 138 und 197 verbinden. Im Zuge dessen wurden die Mutanten M137Q/A138N/I197Q und M137Q/A138N/I197R, sowie M137Q/A138N als Vergleich hergestellt. Die Untersuchung der beiden Tripelmutanten und der Doppelmutante zeigen eine leicht erhöhte Spaltaktivität gegenüber dem Wildtypenzym für die ersten beiden, die durch vermehrte vermehrte Starspaltaktivität der Mutante M137Q/A138N mit verursacht ist. Hier siegelt sich wider, daß Mutationen an der Position 138 die Kopplung von Erkennung und Katalyse soweit relaxieren, daß die Spaltung schneller erfolgt, auch wenn nicht alle Kontakte hergestellt werden können. So erklärt sich die Starspaltung von Einzelmutanten an dieser Position und auch von der M137Q/A138N-Mutante und auch erstaunlich hohe Spaltgeschwindigkeiten von Mehrfachmutanten mit Beeinträchtigung der DNA-Erkennung. Auch in diesem Ansatz konnte keine Erweiterung der Spezifität erzielt werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß ein neu geschaffener und in die große Grube ausgerichtete Kontakt von dem Enzym nicht benötigt wird, da es auf seine Erkennungssequenz evolviert ist und keine neuen Kontakte benötigt, wurde versucht, diese neuen Eigenschaften mit einer Schwächung im *Extend chain*-Motiv zu kombinieren. Dazu wurden die Mutanten A138N/N141A/I197Q und A138N/N141S/I197Q hergestellt. Die Netzwerk bildende Mutante A138N/I197Q wurde der Mutante A138D/I197Q aufgrund ihrer größeren Spalt- und Bindungsaktivität vorgezogen, da die Wahrscheinlichkeit, inaktive Mutanten zu generieren, mit der Anzahl der Mutationen steigt. Als schwächende Position im *Extend chain*-Motiv wurde die Position N141 ausgewählt. Die Einzelmutante N141A ist unter kanonischen Bedingungen gänzlich inaktiv und die Mutante N141S zeigt eine drastisch verringerte Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym [Fritz *et al.*, 1998]. Die Charakteristika der beiden Enzyme lassen keine erweiterte Spezifität erkennen. Die Mutante A138N/N141A/I197Q zeigt im Gegenteil sogar Starspaltung, während die Mutante A138N/N141S/I197Q eine stark verringerte Wildtypaktivität aufweist. Wie Anfangs erwähnt, befindet sich der Rest an Position 197 in einiger Entfernung von der ersten, sowie auch der zweiten Base außerhalb der Erkennungssequenz. Deshalb wurde nachfolgend versucht, diese Distanz zu verringern. Die Überlegung dazu war, den *Loop* an dessen Spitze das Glutamin 197 lokalisiert ist, zu vergrößern. Dazu wurden die drei Insertionsmutanten GlyA/I197Q, GlyB/I197Q und GlyAB/I197Q

hergestellt. In der ersten Mutante ist vor dem Glutamin an Position 197 ein Glycin inseriert, in der zweiten danach und in der dritten an beiden Positionen. Abbildung 34 zeigt den mit dem Programm Swiss PDB-View modellierten vergrößerten *Loop* um die Position 197 der Mutante GlyAB/I197Q im Vergleich zu der Ausdehnung des gleichen *Loops* der Mutante I197Q ohne Glycininsertionen.

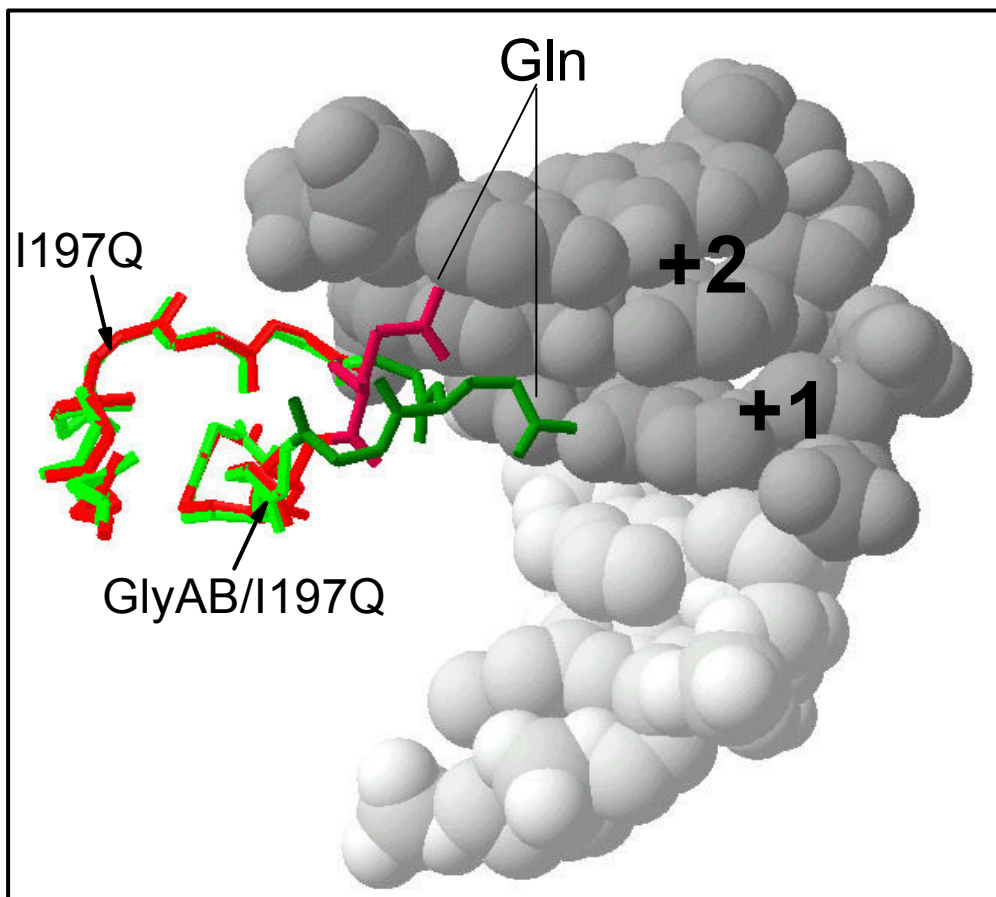


Abb. 34: Vergleich der *Loop*strukturen der Mutanten I197Q (grün) und GlyAB/I197Q (rot).

Aus der Abbildung wird deutlich, daß das Glutamin an Position 197 der Mutante GlyAB/I197Q zum einen weiter in die große Grube hineinragt und zum anderen näher an der ersten Base außerhalb der Erkennungssequenz lokalisiert ist als der gleiche Aminosäurerest der Mutante I197Q.

Von den drei Mutanten zeigt GlyA/I197 eine erhöhte Selektivität, da sie die λ -Spaltstelle nicht spaltet, ist dabei allerdings sehr inaktiv und besitzt keine detektierbare DNA-Bindung. Die Mutante GlyB/197Q ist sowohl in DNA-Bindung, als auch Spaltung vollständig inaktiv. Als einzige Mutante zeigt GlyAB/I197Q das vollständige *EcoRI*-Spaltmuster bei einer 10fach geringeren Spalt- und Bindungsaktivität als der Wildtyp. Wie bereits erwähnt tritt eine verlangsamte

Spaltung der λ -B-Spaltstelle häufiger auf, sodaß die Mutante GlyA/I197Q höchstens einen leichten Hinweis auf eine mögliche Spezifitätserweiterung gibt.

Um den vorherigen Überlegungen, daß unter Umständen die Erkennung abgeschwächt oder daß die Position durch ein Bindungsnetzwerk in die große Grube ausgerichtet werden muß, Rechnung zu tragen und unter Zuhilfenahme der modellierten Struktur der Mutante GlyAB/I197Q (Abb. 34) wurden die Mutanten A142G/GlyAB/I197Q und A138N/GlyAB/I197Q hergestellt. Für die Mutante A138N/GlyAB/I197Q wurde ebenfalls die potentielle Struktur des Loops um Position 197 in Verbindung mit dem Austausch des Ala 138 gegen ein Asparagin modelliert (Abb. 35).

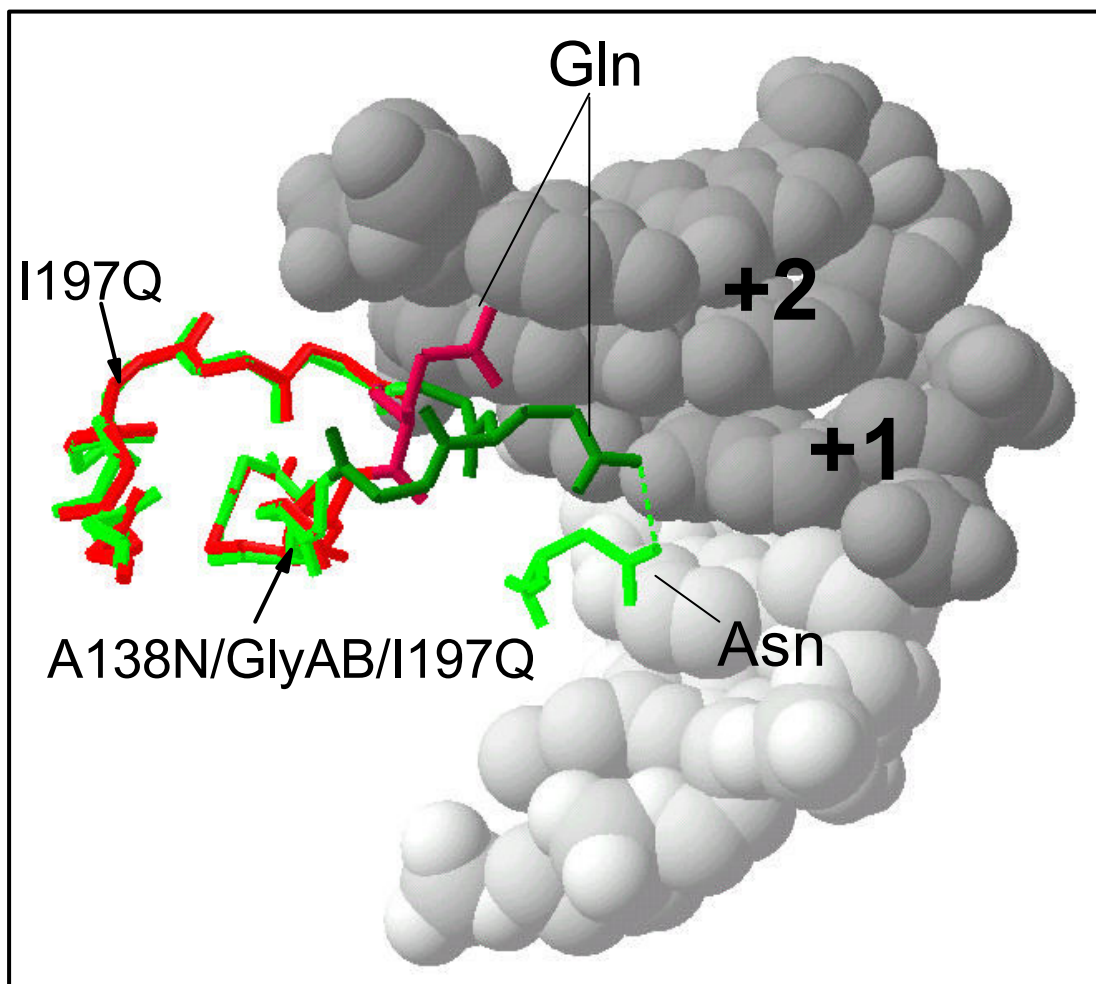


Abb.35: Vergleich der *Loop*strukturen der Mutanten I197Q (grün) und A138N/GlyAB/I197Q (rot).

Mit Hilfe dieses Modells wird erkennbar, daß das zusätzlich gegenüber GlyAB/I197Q mutierte Asn 138 in der Mutante A138N/GlyAB/I197Q die Möglichkeit hat, mit dem Glutamin an Position 197 eine Bindung einzugehen, sowie auch die DNA zu kontaktieren.

Die Mutante A142G/GlyAB/I197Q zeigt keinerlei Spalt- und Bindungsaktivität, wogegen die Mutante A138N/GlyAB/I197Q ein sehr eingeschränktes Spaltpattern auf λ -DNA (Abb. 25) bei sehr geringer Spaltaktivität und nicht detektierbarer Bindung aufweist. Die letztere Mutante spaltet nur die λ -C- und λ -E-Spaltstellen, die dieselben die Erkennungssequenz flankierenden Basen aufweisen und gemäß Abbildung 26 auf eine potentielle palindrome Oktanukleotid-Erkennungssequenz TGAATTCA hinweisen. Das eingeschränkte Spaltpattern der Mutante auf λ -DNA reicht allerdings nicht aus, um eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, ob für dieses Enzym eine gegenüber *EcoRI* erweiterte Spezifität vorhanden ist. Für viele *EcoRI*-Mutanten wurde eine Reduktion der Spaltung der λ -B-Spaltstelle beobachtet, die für die Mutante K130E mit Hilfe des *Site selection*-Assays genauer untersucht wurde [Windolph *et al.*; 1997a]. Dabei wurde der Einfluß der jeweils drei die *EcoRI*-Erkennungssequenz flankierenden Basenpaare, über die Spaltung eines *Random-Plasmid-Pools*, der alle statistisch möglichen Basenpaarkombinationen der Flankensequenzen enthält, betrachtet. Die Mutante K130E zeigte dabei eine Abhängigkeit von der Flexibilität [Satchwell & Travers, 1989] der flankierenden Sequenzen und spaltete bevorzugt, sofern flexiblere Seitensequenzen vorhanden waren. Bei dem Versuch die Spezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRV* über eine semi-rationale *Random*-Mutagenese zu erweitern, wurde ebenfalls eine Bevorzugung von bestimmten flankierenden Bereichen für diverse Mutanten beobachtet, die entweder AT-reiche oder GC-reiche Flankensequenzen privilegiert spalten [Lanio *et al.*, 1998]. In einem weiteren Ansatz über zielgerichtete Mutagenese wurden *EcoRV*-Mutanten hergestellt, die zum einen einseitig auf der 5'-Seite der Erkennungssequenz zwischen einer Purin oder Pyrimidinbase an der Flanke unterscheiden können oder zum anderen ein Thymin an dieser Stelle in der Spaltung stark bevorzugen [Schöttler *et al.*, 1998]. Zu diesen Ergebnissen ist kritisch anzumerken, daß in beiden Fällen nicht ein *Random-Pool* wie im Fall der Mutante K130E als Substrat verwendet wurde, sondern jeweils nur definierte Sequenzen, in denen einzelne flankierende Basen variiert wurden. Entsprechend der Ergebnisse der Mutante K130E, die deutliche Unterschiede in der Spaltpräferenz auf dem *Plasmid-Pool* zeigt, ist es nicht ausreichend nur eine Base außerhalb der Erkennungssequenz zu betrachten, um Aussagen über eine Erweiterung der Spezifität treffen zu können.

Um mit Sicherheit behaupten zu können, daß die Mutante A138N/GlyAB/I197Q eine erweiterte Spezifität hat und die Erkennungssequenz TGAATTCA spezifisch spaltet, mußte somit ein *Site-Selection*-Assay durchgeführt werden. Allerdings konnte in einer ersten Selektionsrunde mit dieser Mutante keine spezifische Anreicherung bestimmter Flankensequenzen erzielt werden. Das deutet an, daß das Enzym wohl keine vollständig erweiterte Spezifität für die genannte Oktanukleotid-Basensequenz besitzt. Dennoch hat das Enzym auf jeden Fall eine stark erweiterte Selektivität, wie sein Spaltverhalten auf λ -DNA zeigt. Die Charakterisierung dieser erweiterten Selektivität ist eine Arbeit, die für die nächste Zeit geplant ist und ebenfalls im *Site selection*-Assay nachweisbar ist. Dazu werden 10% des Plasmid-Pools gespalten, das Spaltprodukt isoliert und anschließend religiert. Um den angereicherten Plasmid-Pool zu amplifizieren, werden damit *E.coli*-Zellen transformiert und daraus die Plasmid-DNA präpariert. Dieser Prozeß wird nachfolgend mehrfach wiederholt und jeweils der *Random*-Bereich des Plasmid-Pools sequenziert. Bei einer Mutante mit einer erhöhten Selektivität sollten mit steigender Wiederholungszahl präferierte Seitensequenzumgebungen feststellbar sein. Das Problem, was bei der A138N/GlyAB/I197 die Durchführung dieses Assays stark erschwert, ist, daß es sich um eine sehr inaktive Mutante handelt und deshalb sehr hohe Konzentrationen in der Spaltung eingesetzt werden müssen. Im *Site Selection*-Assay sollte das Enzym eigentlich im deutlichen Unterschuß gegenüber dem Substrat vorliegen, damit die verschiedenen Sequenzen um die wenigen Enzymmoleküle konkurrieren können. Sonst besteht keine Möglichkeit eine Bevorzugung bestimmter Seitensequenzen zu detektieren weil schon früh freie Enzymmoleküle auch schlechte Sequenzen binden und evtl. spalten. Ein weiteres Problem, das eine Durchführung des Assays über mehrere Runden erschwert, ist der starke Aktivitätsverlust des Enzyms, welches nach maximal zwei Wochen vollständig seine Aktivität verloren hat.

Allerdings stellt die Mutante A138N/GlyAB/I197Q, auch wenn die stark erweiterte Selektivität noch nicht charakterisiert wurde, eine gute Ausgangsposition dar, um über weitere Mutationen ein Enzym mit erweiterter Spezifität zu generieren. Für die Zukunft ist geplant, ausgehend von diesem Enzym kontaktbildende Aminosäuren flankierend zur mutierten Position Gln197 anstelle der hier insertierten Glycine einzubauen.

5 Zusammenfassung

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* erkennt spezifisch die Basensequenz GAATTC und spaltet diese in Gegenwart von Mg^{2+} zwischen dem Guanin und dem Adenin. Die spezifische Erkennung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen van der Waals- und ionischen-Wechselwirkungen zu den Basen und dem Phosphatrückgrat vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf dem charakteristischen Verhalten der Mutante K130E die die Erkennungssequenz, im Gegensatz zum *EcoRI*-Wildtypenzym, nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen bindet, eine potentielle zweite Metallionen-Bindungsstelle außerhalb derjenigen im katalytischen Zentrum untersucht. Durch die Herstellung der Mutanten K130E/D133A, K130E/D135A und K130E/D133A/D135A wurde das typische Metallionen-Bindungsmotiv D133-Q134-D135 zerstört und das Spalt- und Bindungsverhalten der Mutanten charakterisiert. Anhand den im Vergleich zur Mutante K130E verbleibenden relativ hohen Spalt- und Bindungsaktivitäten kann ausgeschlossen werden, daß speziell an dieser postulierten Position ein Metallion gebunden wird, vielmehr ist anzunehmen daß durch Bindung zweiwertiger Kationen an eine noch nicht identifizierte Stelle in der Mutante K130E, sowie den beschriebenen Doppelmутanten und der Tripelmutante, in eine DNA-bindungsfähige Konformation stabilisiert wird.

Für die Aminosäure Lys117 ist ein Kontakt zum Phosphatrückgrat der DNA postuliert. Um diesen Kontakt zu untersuchen, wurde ein Austausch von Lys117 gegen Alanin, Asparagin, Glutamin, Glutamat und Leucin durchgeführt. Die Mutanten K117A, K117D und K117L zeigen stark verminderte Spalt- und Bindungsaktivitäten, was die Hypothese eines Phosphatkontaktes unterstützt. Dagegen zeigen die Mutanten K117E und K117Q nur wenig veränderte Spalt- und Bindungsaktivität gegenüber dem Wildtypenzym. Im Verlaufe der Untersuchungen des Verhaltens von K117E wurde herausgefunden, daß diese hohe Aktivität nicht durch Koordination von ein- oder zweiwertigen Kationen durch den Glutamatrest oder durch einen direkten Phosphatkontakt nach dessen Protonierung zustandekommt. Vielmehr ist die Raumauffüllung durch einen großen, hydrophoben Aminosäurerest an der Position 117 entscheidend für die Ausbildung der direkt benachbarten Phosphat und Basenkontakte durch Gly116, Gln115 und His114, die durch ihre räumliche Nähe an

die Positionierung des katalytischen Zentrums (Lys113, Glu111) unmittelbar gekoppelt sind.

Um Phosphatkontakte des *EcoRI*-Wildtypenzym zu untersuchen, wurden Spalt- und Bindungsaktivitäten mit modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt. Dazu wurden erstmalig dodekamere Methylphosphonat-substituierte Substrate nach R- und S-Konfiguration getrennt verwendet. Im Gegensatz zu schon beschriebenen Thiophosphat- und Ethoxyphosphat-Substitutionen zeigen die Methylphosphonate in der Regel stärkere Effekte, die mit den aus der Kristallstruktur postulierten Kontakten in Einklang stehen.

Der Hauptteil dieser Arbeit befaßte sich mit der Erweiterung der Spezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*. Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese sollte aus *EcoRI* ein Enzym, daß eine Oktanukleotid-Basensequenz erkennt, die der um je ein Basenpaar erweiterten *EcoRI*-Erkennungssequenz entspricht, hergestellt werden. Da Mutationen der Position Ile197, die auf die Schaffung neuer Kontakte ausgerichtet waren, noch keine Spezifitätserweiterung zeigten, wurden Mehrfachmutanten hergestellt und charakterisiert, in denen (i) zusätzlich die Erkennung der *EcoRI*-Basensequenz gewächt wurde oder (ii) ein Wasserstoffbrückennetz zur Ausrichtung des Aminosäurerestes an der Position 197 in die große Grube aufgebaut wurde, oder (iii) die Distanz zwischen der DNA und der Position 197 durch Insertion von Glycinresten verkürzt wurde, oder (iv) diese Ansätze kombiniert wurden.

Das Ergebnis dieser Bemühungen ist die Mehrfachmutante A138N/GlyAB/I197Q mit stark erweiterter Selektivität, die anstelle der fünf *EcoRI*-Spaltstellen auf der DNA des λ -Phagen nur zwei Spaltstellen spaltet, die beide mit ihren flankierenden Basen zur *EcoRI*-Erkennungssequenz die palindrome Oktanukleotid-Basensequenz TGAATTCA ergeben. Aufgrund ihrer relativ geringen Aktivität, die stark durch ihre Instabilität mit beeinflußt ist, konnte nicht definitiv zwischen einer erweiterten Spezifität und einer deutlich verstärkten Selektivität unterschieden werden. Trotzdem wird diese Mutante als Ausgangspunkt dienen, ein Enzym mit einer eindeutig erweiterten Spezifität zu generieren.

Schlagnworte: *EcoRI*, Metallionen-Bindungsstelle, Phosphatkontakte, Methylphosphonate, Spezifitätserweiterung.

5.1 Abstract

The restriction endonuclease *EcoRI* binds and cleaves (in the presence of Mg^{2+}) within the palindromic double stranded DNA sequence -GAATTC- with very high specificity. The specificity is given through formation of many contacts to bases in the major groove of the recognition sequence and to the phosphodiester backbone.

In the present work a potential second metal ion binding-site outside of the catalytic center of *EcoRI* was examined. Basic to this work is the behaviour of the mutant K130E, which, in contrast to the wildtype enzyme, binds DNA specifically only in the presence of divalent cations. By generating the mutants K130E/D133A, K130E/D135A and K130E/D133A/D135A we destroyed a typical metal-ion binding motif D133-Q134-D135 next to position 130. The mutants still displayed relative high cleavage and binding activity compared to K130E. Therefore, we concluded that this position is not important for metal-ion binding. We rather assume that through the binding of divalent cations, not necessarily next to the DNA, these mutants reach a conformation capable of DNA-binding.

In order to investigate the postulated phosphate contact by lysine 117 we mutated it to alanine, asparagine, glutamate, glutamine or leucine. For the mutants K117A, K117D and K117L a strongly reduced DNA cleavage and binding activity was detected, supporting a direct phosphate contact. In contrast the mutants K117E and K117Q showed only slightly altered cleavage and binding behaviour compared to the wildtype enzyme. During the examination of the mutant K117E we found that the high activity is neither due to coordination of a mono or divalent cation between the glutamate residue and the phosphate nor through a direct contact by the protonated residue. It is rather important that the position 117 is filled by a voluminous hydrophobic aminoacid residue, because this influences the phosphate and base contacts by Gly116, Gln115, His114, and the catalytic center with the residues Lys113 and Glu111 in the neighbourhood.

Furthermore, we determined the DNA cleavage and binding activity of the wildtype enzyme with dodecameric methylphosphonates which were separated in R and S configuration. Methylphosphonate substituted oligonucleotides were never used before with the *EcoRI* restriction endonuclease and resulted in stronger effects than those with thiophosphate and ethoxyphosphate substrates. All the results are always in unity with the postulated contacts based on the crystal structure of *EcoRI*.

The main part of the present work was dedicated to the generation of an *EcoRI* mutant with an altered sequence specificity. By site directed mutagenesis we tried to achieve an enzyme with an enlarged recognition site from 6 to 8 base pairs, with the canonical sequence in the center. Out of the first experiments we realized that a single mutation at the position Ile197 above the major groove beside the *EcoRI* recognition site is not sufficient for the creation of new contacts. Based on these mutations we produced and characterized multiple mutants where we (i) additionally weakened the canonical recognition of the *EcoRI* site or (ii) created a hydrogen bonding network for stabilizing the amino acid residue at position 197 within the major groove or (iii) inserted amino acid residues in the loop next to position 197 to shorten the distance to the DNA or (iv) combined several of these attempts.

The mutant A138N/GlyAB/I197Q showed a strongly enlarged selectivity on λ -phage DNA as substrate. From the five *EcoRI* recognition sites this mutant only cleaved those two sites, which have the same palindromic octanucleotide sequence TGAATTCA. It was not possible to distinguish between an enlarged specificity or a strongly increased selectivity, because of low activity and instability of the enzyme. This mutant will serve as a promising startpoint for further attempts to create a restriction enzyme with enlarged specificity.

Keywords: *EcoRI*, metal-ion binding site, phosphate contacts, methylphosphonates, enlargement of specificity

6 Literaturverzeichnis

- Alves, J., Pingoud, A., Langowski, J., Urbanke, C., and Maass, G. (1982)
Two identical subunits of the *EcoRI* restriction endonuclease co-operate in the binding and cleavage of the palindromic substrate
Eur. J. Biochem. **124**, 139-142
- Alves, J., T. Rüter, A. Fliess, G. Maass, and A. Pingoud (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**, 2678-2684
- Alves, J., Urbanke, C., Fliess, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1989b)
Stopped flow-kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* restriction endonuclease
Biochemistry. **28**, 7879-7888
- Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P. A. Wilson, K. S., and Kokkinidis, M. (1994).
Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*.
Nat. Struct. Biol., **1**, 469-475.
- Ban, C. and Yang, W. (1998)
Structural basis for MutH activation in E-coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases.
EMBO J. **17**, 1526-1534.
- Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R. and Stunnenberg, H.G. (1993)
Improved method for *PCR*-mediated site-directed mutagenesis
Oxford Univ. Press, **22**, 541-542
- 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 Laboratory Press*, Cold Spring Harbor N.Y.
- Botterman, J., and Zabeau, M. (1985)
High level production of the *EcoRI* endonuclease under the control of the P_L -Promotor of Bacteriophage
Gene **37**, 229-239
- Bozic, D., Grazulis, S., Siksnys, V., and Huber, R. (1996)
Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr10I* at 2.15Å resolution
J. Mol. Biol. **255**, 176-186

- Cheng, X., Balendiran, K., Schildkraut, I., and Anderson, J.E. (1995)
Structure of *PvuII* endonuclease with cognate DNA
EMBO J. **13**, 3927-3935
- 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
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989)
One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 2172
- Connolly, B.A., Eckstein, F., and Pingoud, A. (1984)
The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI* catalyzed reaction
J. Biol. Chem. **259** (17): 10760
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C. Elliott, W. H. and Jones, K. M. (1969)
Data for biochemical research **2**, 1-63
- Dorner, L.F. & Schildkraut, I. (1994)
Direct selection of binding proficient/catalytic deficient variants of *BamHI* endonuclease
Nucleic Acids Res. **22** (6): 1068
- 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., and Jen-Jakobson, L. (1997)
Specific binding by *EcoRV* endonuclease to its DNA recognition site GATATC
J. Mol. Biol. **269**, 82-101
- Flores, H., Osuna, J., Heitman, J. and Soberon, X. (1995)
Saturation mutagenesis of His114 of *EcoRI* reveals relaxed specificity mutants
Gene, **157**, 295-301
- Frey, P. A. and Sammons, R. P. (1985)
Bond order and charge localisation in nucleoside phosphothioates
Science. **228**, 541-545

- Fritz, A. (1991)
Herstellung und Charakterisierung der Mutanten N141S, A, D, Y der Restriktionsendonuklease *EcoRI*
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Fritz, A. (1994)
Protein *Engineering* von Enzymvarianten des *Extended Chain*-Motivs der Restriktionsendonuklease *EcoRI*.
Dissertation, Universität Hannover
- Fritz, A., Küster, W., and Alves, J. (1998)
Asn141 is essential for DNA recognition by *EcoRI* restriction endonuclease
FEBS Letters. **438**, 66-70
- Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A., Wolfes, H., Pingoud, V., Urbanke, C., Maass, G., Pingoud, A., Düsterhöft, A., and Kröger, M. (1989)
Genetic engineering of *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**, 2667-2677
- Goodman, H. M., Greene, P. J., Garfin, D. E., and Boyer, H. W. (1977)
DNA Site Recognition by the *EcoRI* Restriction Endonuclease and Modification Methylase.
New York: Academic Press. (Ed. Vogel, H., J.)
- Grabowski, G. (1993)
Charakterisierung des aktiven Zentrums der Restriktionsendonuklease *EcoRI* mithilfe zielgerichtet hergestellter Mutanten
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Grabowski, G., Jeltsch, J., Wolfes, H., Maass, G., and Alves, J. (1995)
Site-directed mutagenesis on the catalytic center of the restriction endonuclease *EcoRI*
Gene **157**, 113-118
- 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
- Greene, P.J., Gupta, M., and Boyer, H.W. (1981)
Sequence analysis of the DNA encoding the *EcoRI* restriction endonuclease and methylase
J. Biol. Chem. **256**, 2143-2153
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. **166**: 557

- Hedgpeth, J., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1972)
DNA Nucleotide Sequence Restricted by the RI Endonuclease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 3448-3452.
- Heitman, J., and Model, P. (1990)
Mutants of the *EcoRI* endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition
EMBO. J. **9**, 3369-3378
- Heitman, J. (1992)
How the *EcoRI* Endonuclease recognizes and cleaves DNA.
BioEssays, **14**, 445-454.
- Heitman, J. (1993)
On the origins, structures and functions of restriction-modification enzymes
Genetic engineering (Setlow, J.K., Ed.): **57**, Plenum Press, New York
- Hochuli, E. (1990)
Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbents.
Genetic Engineering, Principle and Methods (J. K. Setlow, ed.), Plenum Press, New York **12**, 87-98
- Hsu, M., and Berg, P. (1978)
Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing Mg^{2+} with Mn^{2+}
Biochem. **17**, 131-138
- Janulaitis A., Petrusyte M., Maneliene Z., Klimasauskas S., and Butkus V., (1992 a)
Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase-prototype of a new class (type IV)
Nuc. Ac. Res. **20**, 6043-6049
- Janulaitis A., Petrusyte M., Timinskas A., Klimasauskas S., and Butkus V., (1992 b)
Cloning and sequenc analysis of the gene coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzymes
Nuc. Ac. Res. **20**, 6051-6056
- Jeltsch, A., Alves, A., Maass, G., and Pingoud, A. (1992)
On the catalytic machnism of *EcoRI* and *EcoRV*
FEBS **304**, 4-8
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1993)
Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes
Biochemistry **90**: 8499
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1994)
Pausing of the restriction endonuclease *EcoRI* during linear diffusion on DNA
Biochemistry **33**, 10215-10219

- Jeltsch, A., Maschke, H., Selent, U., Wenz, C., Köhler, E., Connolly, B.A., Thorogood, H. & Pingoud, A. (1995)
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
- Jeltsch, A., Wenz, C., Stahl, F. and Pingoud, A. (1996)
Linear diffusion of the restriction endonuclease *EcoRV* on DNA is essential for *in vivo* function of the enzyme
EMBO J. **15**, 5104
- Jen-Jacobsen, L. (1997)
Protein-DNA recognition complexes: Conservation of structure and binding energy in the transition state
Biopolymers. **44**, 153-180
- Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J., and Rosenberg, J.M. (1990)
Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: A revised protein chain tracing
Science **249**, 1307-1309
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., and Cheng, X. (1994)
Sequence Motifs Characteristics of DNA [Cytosine N-] Methyltransferase: Similarity to Adenine and Cytosine-C5 DNA Methylases
Nuc. Acids Res. **17**, 9823-9832
- Kostrewa, D., and 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 2 Å resolution
Biochem. **34**, 683-696
- Kovall, R. A., Matthews, B. W. (1998)
Structural, functional, and evolutionary relationships between λ -exonuclease and type II restriction endonucleases
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**, 7893-7897
- Koziolkiewicz, M., and Stec, W. J. (1992)
Application of phosphate-backbone-modified oligonucleotides in the studies on *EcoRI* endonuclease mechanism of action
Biochemistry. **31**, 9460-9466
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., and Fritz, H. J. (1984)
The gapped-duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction.
Nucl. Acids Res. **12**, 9441-9456
- Krüger D. H., Kupper D., Meisel A., Reuter M., and Schroeder C. (1995)
The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral DNA genomes
FEMS Microbiol. Rev. **17**, 177-184

- Küster, W. (1998)
Bedeutung hydrophober Kontakte für die sequenzspezifische DNA-Erkennung der Restriktionsendonuklease *EcoRI*
Dissertation, Universität Hannover
- Kurpiewski, M.R., Koziolkiewicz, M., Wilk, A., Stec, W.J., and Jen-Jacobson, L. (1996)
Chiral phosphorothioates as probes of protein interactions with individual DNA phosphoryl oxygens: essential interactions of *EcoRI* endonuclease with the phosphate at GAATTC
Biochemistry **35**, 8846-8854
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680
- Lane, A.N., Jenkins, T.C., Brown, T. and Neidle, S. (1991)
Interaction of berenil with the *EcoRI* dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ in solution studied by NMR.
Biochemistry **30**, 1372-1385
- Lanio, T., Selent, U., Wenz, C., Wende, W., Schulz, A., Adiray, M., Katti, S. B. and Pingoud, A. (1996)
EcoRV-T94V: a mutant restriction endonuclease with an altered substrate specificity towards modified oligonucleotides
Protein Engineering. **9**, 1005-1010
- Lanio, T., Jeltsch, A., and Pingoud, A. (1998)
Towards the design of rare cutting restriction endonucleases: using directed evolution to generate variants of *EcoRV* differing in their substrate specificity by two orders of magnitude
JMB. **283**, 59-69
- Langowski, J., Urbanke, C., Pingoud, A., and Maass, G. (1981)
Transient cleavage kinetics of the *EcoRI* restriction endonuclease measured in a pulsed quench-flow apparatus: enzyme concentration-dependent activity change.
Nucl. Acids Res., **9 (14)**, 3483-3490.
- Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R. & Jen-Jacobson, L. (1990)
The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction
Science **250**: 776
- Luke, P.A. & Halford, S.E. (1985)
Solubility of the *EcoRI* restriction endonuclease and its purification from an overproducing strain
Gene **37** 241-246
- Luria S. E., and Human M. L. (1952)
A Nonhereditary, Host-Induced Variation of Bacterial Viruses.
J. Bacteriol. **64**, 557-569.

- McClarín, J.A., Fredenrick, C.A., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J., and Rosenberg, J.M. (1986)
Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3 Å resolution
Science **234**, 1526-1541
- Modrich, P., and Zabel, D. (1976)
EcoRI endonuclease physical and catalytic properties of the homogenous enzyme
J. Biol. Chem. **256**, 5866-5876
- Mullis, K., and Faloona, F. (1987)
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction
Methods Enzymology **155**, 335-350
- Nastri, H.G., Evans, P.D., Walker, I.H., and Riggs, P.D. (1997)
Catalytic and DNA binding properties of *PvuII* restriction endonuclease mutants
J. Biol. Chem. **272** 25761-25767
- Newman, A.K., Rubin, R.A., Kim, S.H., and Modrich, P. (1981)
DNA sequences of structural genes for *EcoRI* DNA restriction and modified enzymes
J. Biol. Chem. **256**, 2131-2139
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K. (1994)
Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding
Nature **368**, 660-664
- Newman, M., Lunnen, K., Wilson, G., Greci, J., Schildkraut, I. and Phillips, E. V. (1998)
Crystal structure of restriction endonuclease *BglI* bound to its interrupted DNA recognition sequence
EMBO J. **17**, 5466-5476
- Oelgeschläger, T. (1992)
Protein-Engineering an der Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Konstruktion von Enzymvarianten mit erweiterter Substratspezifität
Dissertation, Universität Hannover
- Peters, F. and Greipel, J. (1993)
„Computerprogramm Circular“
Handbuch der Biophysikalischen Meßgeräteabteilung, MH-Hannover
- Pingoud, A. (1985)
Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases
Eur. J. Biochem. **147**, 105-109
- Pingoud, A., and Jeltsch, A. (1997)
Recognition and cleavage of DNA by type II restriction endonucleases
Eur. J. Biochem. **246**, 1-22

Polisky, B., Greene, P., Garfin, D. E., McCarthy, B. J., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1975).

Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72(9)**, 3310-3314.

Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., and Brammar, W.J. (1985)

Cloning Vectors

Roberts, R.J., and Macelis D. (1999)

REBASE restriction enzymes and methylases

Nucl. Acids Res. **25** 248-262.

Rosati, O. (1996)

Klonierung und Charakterisierung der IS1-Transposase in verschiedenen Zellsystemen

Diplomarbeit, Universität Hannover

Rosenberg, J.M. (1991)

Structure and function of restriction endonucleases

Curr. Op. Struct. Biol. **1**, 104-113

Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I. & Banzhak, L.J. (1975)

Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases in *The Enzymes* (Boyer, P., Ed.): 61

Rotzal, L.-U. (1992)

Molekulargenetische Konstruktion, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung des *EcoRI*-His₆ Fusionsproteins.

Diplomarbeit, Universität Hannover

Saiki, R. K., Lawyer, F. C., Stoffel, S., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D. H. (1989)

Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*.

J. Biol. Chem. **264**, 6427-6437

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467

Satchwell, S. C., Drew, H. RE., and Travers, A.A. (1986)

Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA.

J. Mol. Biol. **191**, 639-659

Schneider-Mergener, J., Kramer, A., Reineke, U. (1996)

Peptide libraries bound to continuous cellulose membranes: Tools to study molecular recognition

aus „Combinatorial libraries“, ed. Riccardo Cortese, *W. deGruyter*, New York

- Schöttler, S., Wenz, C., Lanio, T., Jeltsch, A., and Pingoud, A. (1998)
Protein engineering of the restriction endonuclease *EcoRV*. Structure-guided design of enzyme variants that recognize the base pairs flanking the recognition site
Eur. J. Biochem. **258**, 184-191
- Sturrock S.S., and Dryden T.F. (1997)
A prediction of the amino acids and structures involved in DNA recognition by type I DNA restriction and modification enzymes
Nucleic Acids Res. **25** 3408-3414
- Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F., and Pingoud, A. (1992)
A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *EcoRV*
Biochem. **31**, 4808-4815
- Siksnys, V., Zareckaja, N., Vaisvila, R., Timinskas, P., Butkus, V., and Janulaitis, A. (1994)
CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R·*MunI* and R·*EcoRI*
Gene **142**: 1
- Terry, B.J., Jack, W.E., Rubin, R.A., and Modrich, P. (1983)
Thermodynamic parameters governing interaction of *EcoRI* endonuclease with specific and nonspecific DNA sequences
J. Biol. Chem. **258** (16) 9820-9825
- 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., and Pingoud, A., (1990)
Accuracy of the *EcoRI* restriction endonuclease: Binding and cleavage studies with oligodeoxynucleotide substrates containing degenerate recognition sequences.
Biochemistry **29**, 6416-6422
- Thorogood, H., Grasby, A., and Connolly, A. (1996)
Influence of the phosphate backbone on the recognition and hydrolysis of DNA by the *EcoRV* restriction endonuclease
J. Biol. Chem. **15**, 8855-8862
- Vieira, J., and Messing, J. (1982)
The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers
Gene **19**, 259-268
- Vipond, I.B., and Halford, S.E. (1995)
Specific DNA recognition by *EcoRV* restriction endonuclease induced by calcium ions
Biochemistry **34**, 1113-1119

- 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
- Wah, D., Hirsch, J. A., Dorner, L. F, Schildkraut, I. and Aggarwal, A. K. (1997)
Struktur der multimodularen Endonuklease *FokI* gebunden an DNA
Nature **388**, 97-100
- Windolph, S. (1996)
Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphatkontakte für Spezifität und katalytische Aktivität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*
Dissertation, Universität Hannover
- Windolph, S., Fritz, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., and Alves, J. (1997a)
Sequence context influencing cleavage activity of the K130E mutant of the restriction endonuclease *EcoRI* identified by a site selection assay
Biochem. **36**, 9478-9485
- Windolph, S. & Alves, J. (1997b)
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. and Wilson, K.S. (1993)
The crystal structure of *EcoRV* endonuclease and its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments
EMBO J. **12** (5), 1781-1795
- Wolfes, H., Alves, J., Fliess, A., Geiger, R., and Pingoud, A. (1986)
Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 und Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *EcoRI*
Nucl. Acid Res. **14**: 9063
- Woodhead, J.L., Bhave, N., and Malcolm, A.D.B.
Cation dependence of restriction endonuclease *EcoRI*-activity
Eur. J. Biochem. **115**, (1981) 293-296
- Xu, S.-Y. & Schildkraut, I. (1991)
Isolation of *BamHI* variants with reduced cleavage activities
J Biol. Chem. **266**: 4425
- Zabeau, M., and Stanley, K.K. (1982)
Enhanced expression of cro-B-galactosidase fusion protein under control of the promoter of bacteriophage λ .
EMBO J. **1**, 1217
- Zhang, X., Duggan, L. J. L. and Gottlieb, P. A. (1993)
Loading dyes used in gel electrophoresis alter the apparent thermodynamic equilibrium of the *lac* repressor operator complex
Anal. Biochem. **214**, 580-582

7 Anhang

7.1 *Eco*RI-Basen- und Aminosäuresequenz

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Lebenslauf:

Olaf Rosati (geb. Sauermilch)
geboren am 22 August 1966
in Hannover
verheiratet mit Gabriela und
Vater von Tino

Berufliche Tätigkeit

seit Januar 1997 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
Anfertigung einer Dissertation
Thema: „Untersuchung von DNA-Kontakten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* inner- und außerhalb der Erkennungssequenz“

Bildungshintergrund

1990-1996 Biochemiestudium an der Universität Hannover
Abschluß: Diplom-Biochemiker
Note: sehr gut
Thema der Diplomarbeit: „Klonierung und Charakterisierung der IS1-Transposase in verschiedenen Zellsystemen“

1988-1990 Ausbildung zum biologisch technischen Assistenten (BTA) an der Bernd-Blindow-Schule Hannover
Abschluß: Staatlich anerkannter BTA

Schulbildung

1973-1986 Besuch der Grundschule und Orientierungsstufe Ahlem
Besuch des Georg-Büchner-Gymnasiums Letter
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zusätzliche Qualifikationen

Fortbildungslehrgang „Gentechnische Sicherheit“
nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV

Lehrgang im Umgang mit offenen radioaktiven Nukliden
Vermittlung der Fachkunde gemäß § 6 StrSchV für die
Fachkundegruppe 4.2

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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.

Hannover den 02.11.1999

Olaf Rosati