

# **Bedeutung der Dimerisierung für Spezifität und Katalyse der Restriktionsendonuklease *EcoRI***

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

genehmigte Dissertation  
von

Dipl. Chem. Petra Vennekohl  
geboren am 04.06.1971

Hannover 1999

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biophysikalische Chemie (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Jürgen Alves) an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.03.1996 bis zum 30.11.1999 unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Alves angefertigt.

Tag der Promotion: 31.01.2000

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

**meinen Eltern gewidmet**



# I VERÖFFENTLICHTE POSTERABSTRACTS

Der präsentierende Autor ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

**Vennekohl, P.** and Alves, J.

*EcoRI* restriction endonuclease goes heterodimeric

*Prot. Science* **8**, 55; 3<sup>rd</sup> European Symposium of the Protein Society, Garmisch-Partenkirchen (1999)

**Alves, J.**, Grabowski, G., Küster, W., Rosati, O., and **Vennekohl, P.**

Protein design within the *EcoRI* restriction endonuclease

*Biol. Chem.* **379**, 45; Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Jena (1998)

**Alves, J.**, Grabowski, G., Küster, W., and **Vennekohl, P.**

Towards the change in sequence specificity of the restriction endonuclease *EcoRI*

*Biol. Chem.* **378**, 155; Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Tübingen (1997)

**Vennekohl, P.** and Alves, J.

Destabilisation of the dimeric restriction endonuclease *EcoRI* and characterization of monomeric mutants

*Biol. Chem.* **377**, 146; Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Leipzig (1996)

**Alves, J.**, Grabowski, G., Frank, R., and **Vennekohl, P.**

Changing the specificity of the restriction endonuclease *EcoRI*

*Biol. Chem.* **377**, 146; Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Leipzig (1996)

# II POSTER- UND TAGUNGSBEITRÄGE

**Alves, J.**, Grabowski, G., Küster, W., Rosati, O., and **Vennekohl, P.**<sup>1</sup>

Protein design within the *EcoRI* restriction endonuclease

FASEB Summer Research Conference on Nucleic Acid Enzymes: Mechanisms and Diseases, Saxtons River (1998)

**Vennekohl, P.**<sup>2</sup>

A real sticky end – problems with the His-tag  
Restriction/Modification Meeting, Berlin (1998)

**Alves, J.**, Grabowski, G., Küster, W., and **Vennekohl, P.**<sup>2</sup>

Positive selection of mutants of restriction enzymes with changes in sequence specificity  
4<sup>th</sup> NEB Workshop on Biological DNA Modification, Iglis (1997)

**Vennekohl, P.**, Frank, R., and Alves, J.<sup>1</sup>

Probing specific DNA recognition of the restriction endonuclease *EcoRI* with a synthetic peptide library  
4<sup>th</sup> NEB Workshop on Biological DNA Modification, Iglis (1997)

**Alves, J.**, G. Grabowski, W. Küster, **P. Vennekohl**, and S. Windolph<sup>2</sup>

Mechanism of DNA recognition and cleavage by restriction enzymes  
15. Konferenz der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Gießen (1995)

**Vennekohl, P.** and Alves, J.<sup>1</sup>

Importance of the hydrophobic contacts for the stabilisation of the dimeric restriction endonuclease *EcoRI*  
15. Konferenz der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Gießen (1995)

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

### III DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für seine Unterstützung und die unzählbaren Diskussionen, die immer wieder in Ausbrüchen geballter Intelligenz gipfelten.
- Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Korreferates.
- Frau Dr. Gabriele Grabowski für die unschätzbare Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit, die tolle Zeit im Labor und die Freundschaft, die daraus entstanden ist.
- Frau Urbana Kayßer für die kompetente Unterstützung meiner Arbeit (nicht nur) durch die zahlreichen Kinetiken und Gänge zum Max-Planck-Institut.
- Herrn Dr. Wolfgang Küster für seine gute Laune (meistens) zur richtigen Zeit.
- meinem Mitdoktoranden Herrn Olaf Rosati für die Jahre guter Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. Heiner Wolfes für die vielen Anregungen in zahllosen Seminaren und die prompte Synthese etlicher Oligonukleotide.
- Herrn Prof. Dr. Claus Urbanke für die Durchführung der Analytischen Ultrazentrifugationen und die unersetzliche Hilfe bei deren Auswertungen.
- Herrn Dr. Ronald Frank und Herrn Dr. Werner Tegge für die Synthese der Peptidbibliothek und der freien Peptide.
- nicht zuletzt allen weiteren Mitgliedern der Abteilungen Biophysikalische Chemie und Biochemisch-Biophysikalische Verfahren, die allein durch die angenehme Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- meinen guten Freunden, die mir in allen Lebenslagen zur Seite stehen.
- meinen Eltern und meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Martin Fritsche... für alles.

## IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampère
AA	Acrylamid
AAP	Agarose-Auftragspuffer
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid
Bis	N,N-Methylen-bisacrylamid
BMH	Bismaleimidohexan
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C-	Carboxyl-
CD	Circulardichroismus
Chl	Chloramphenicol
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
dd	didesoxy
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMS	Dimethylsuberimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EGS	Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
$\epsilon^{xxxnm}$	Extinktionskoeffizient bei xxx nm
EtBr	Ethidiumbromid
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GDA	Glutardialdehyd
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gua/HCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperidinthansulfonsäure
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
k	kilo
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
m	milli oder Meter
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
min	Minute(n)
$\mu$	mikro
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

n	nano
N-	Amino-
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD <sub>xxxnm</sub>	optische Dichte bei xxxnm
Oligonukleotid	oligomeres Desoxyribonukleotid
p	pico oder Plasmid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
r	ribo
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylphosphat
s	Sekunde(n)
ST	<i>Saline tris buffer</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
Tet	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPE	Tris-Posphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTE	Tris-Taurin-EDTA-Puffer
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit (Einheit)
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
wt	Wildtyp

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

Mutanten werden benannt, indem an die auszutauschende Aminosäure mit anschließender Positionsnummer das Kürzel der eingeführten Aminosäure angehängt wird. L158D bezeichnet die Mutante der Position 158, bei der das Leucin gegen Asparat ausgetauscht wurde.

# V INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Restriktionsendonukleasen	1
1.2	Die Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	2
1.2.1	Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion	5
1.2.2	Spezifische DNA-Bindung und Kopplung zur Katalyse	6
1.2.3	Katalyse	9
1.2.4	Bedeutung der Dimerisierung für <i>EcoRI</i>	11
1.3	Vergleich von <i>EcoRI</i> mit Restriktionsendonukleasen bekannter Kristallstruktur	13
1.4	Ziele der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme	18
2.2	Mikrobiologische Methoden	18
2.2.1	Nährmedien	18
2.2.2	Bakterienstämme	19
2.2.3	Plasmidvektoren	20
2.2.4	Transformation von Bakterienzellen	22
2.2.4.1	Chemisch kompetente Zellen und Transformation	22
2.2.4.2	Elektrokompetente Zellen und Elektrottransformation	23
2.2.5	Expressionstest und Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß	24
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.3.2	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	25
2.3.3	Ligation	26
2.3.4	Modifikation von Oligonukleotiden	26
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.3.6	Elektrophoretische Trennung von DNA	28
2.3.6.1	Agarosegel-Elektrophorese	28
2.3.6.2	Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese	29
2.3.6.3	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese ( <i>Shadowcasting</i> -Gel)	30
2.3.7	<i>Gapped duplex</i> -Mutagenese	31
2.3.8	Konstruktion des Fusionsproteins <i>EcoRI</i> <sub>StrepII</sub>	33
2.3.9	Klonierung einer polycistronischen <i>Message</i> aus zwei <i>ecoRI</i> -Genen	34
2.3.10	DNA-Sequenzierung	34
2.3.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.4	Proteinisolierung	36
2.4.1	Fermentation	36
2.4.2	Ultraschallzellaufschluß	37
2.4.3	Affinitätschromatographie	37
2.4.3.1	Affinitätschromatographie mit dem Hexahistidintag	37
2.4.3.2	Affinitätschromatographie mit dem <i>StrepTag II</i> -System	38
2.4.4	Ionenaustauschchromatographie	39
2.4.5	Dialyse von Proteinlösungen	40

<b>2.5</b>	<b>Proteincharakterisierung</b>	<b>40</b>
2.5.1	Konzentrationsbestimmung	40
2.5.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli	41
2.5.3	<i>Blue native</i> -Elektrophorese	42
2.5.4	Immunoblot	44
2.5.5	Circulardichroismus	45
2.5.6	Analytische Ultrazentrifugation	46
2.5.7	Enzymatischer Abbau des Hexahistidintags	46
2.5.8	<i>Peptide mapping</i> mit Trypsin	47
2.5.9	Gelretardations-Assay	48
2.5.10	Bestimmung der Spaltaktivität von <i>EcoRI</i>	50
2.5.11	Bestimmung der Spaltaktivität von Proteinen mit der Mutation L158D	51
2.5.12	<i>Cross link</i> -Experimente	52
2.5.13	Gelfiltration	55
<b>2.6</b>	<b>Charakterisierung der DNA-Bindung der <i>Extended chain</i>-Peptide</b>	<b>55</b>
2.6.1	Bindungsexperimente im Zwei-Phasen-System	55
2.6.1.1	Synthese der Peptidbibliothek	55
2.6.1.2	Bindung von Oligonukleotiden an die Peptidbibliothek	56
2.6.2	DNA-Bindungsexperimente in Lösung	59
2.6.2.1	Peptidsynthese	59
2.6.2.2	Bindung freier Peptide an Plasmid-DNA	60
2.6.2.3	Bindung freier Peptide an Oligonukleotide	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen der Dimerisierungseigenschaften von wt-<i>EcoRI</i> und Mutanten der Position Leu158 in Abhängigkeit vom Affinitätstag</b>	<b>64</b>
3.1.1	Untersuchungen zum Dimerisierungszustand von L158D <sub>His6</sub>	65
3.1.1.1	<i>Blue native</i> -Elektrophorese	65
3.1.1.2	<i>Peptide mapping</i> mit Trypsin	67
3.1.1.3	<i>Cross link</i> -Experimente	68
3.1.1.4	Charakterisierung der Spaltaktivität der Proteine mit der Mutation L158D	72
3.1.2	Weitere Mutanten an den Positionen 158 und 230	74
3.1.2.1	Herstellung und Aufreinigung der Mutanten	75
3.1.2.2	Charakterisierung	75
3.1.3	Analytische Ultrazentrifugation von Hexahistidin-Fusionsproteinen	78
3.1.4	Enzymatischer Abbau des Hexahistidintags durch Carboxypeptidase A	79
3.1.5	Untersuchungen mit wt- <i>EcoRI</i> <sub>StrepII</sub>	83
3.1.5.1	Klonierung und Aufreinigung	83
3.1.5.2	Charakterisierung von wt- <i>EcoRI</i> <sub>StrepII</sub>	84
3.1.6	Untersuchungen mit L158D <sub>StrepII</sub>	85
3.1.6.1	Klonierung und Aufreinigung der Mutante L158D <sub>StrepII</sub>	85
3.1.6.2	Charakterisierung von L158D <sub>StrepII</sub>	86
3.1.7	Gelfiltration mit <i>StrepTag II</i> -Fusionsproteinen	87
<b>3.2</b>	<b>Heterodimerisierung von <i>EcoRI</i></b>	<b>89</b>
3.2.1	Erzeugung von Heterodimeren durch <i>Cross link</i> -Experimente	89
3.2.1.1	Erzeugung und Charakterisierung der Stabilitätsmutanten	90
3.2.1.2	Erzeugung und Charakterisierung der Cystein-Einzelmutanten	92
3.2.1.3	<i>Cross link</i> -Experimente mit Cystein-Einzelmutanten	93
3.2.1.4	Erzeugung und Charakterisierung von Cystein-Doppelmutanten	99
3.2.1.5	<i>Cross link</i> -Experimente mit Cystein-Doppelmutanten	101

3.2.2	Erzeugung einer heterodimeren <i>EcoRI</i> durch Koexpression in <i>E.coli</i>	102
3.2.2.1	Konstruktion der polycistronischen <i>Message</i>	102
3.2.2.2	Aufreinigung der koexprimierten Heterodimeren	103
3.2.2.3	Charakterisierung der heterodimeren Proteine	103
<b>3.3</b>	<b>DNA-Bindungseigenschaften synthetischer Extended chain-Peptide</b>	<b>105</b>
3.3.1	Bindungsexperimente immobilisierter Peptide mit Oligonukleotiden	107
3.3.1.1	Membran A	107
3.3.1.2	Membran B	115
3.3.2	Bindungsexperimente freier Peptide an Plasmid-DNA	121
3.3.3	Bindungsexperimente freier Peptide an Oligonukleotide	124
3.3.3.1	Bindung unmodifizierter Peptide an Oligonukleotide	128
3.3.3.2	Bindung modifizierter Peptide an Oligonukleotide	131
3.3.3.3	Bindung in Gegenwart von poly-dIdC	133
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>135</b>
4.1	Dimerisierungszustand von wt- <i>EcoRI</i> und Mutanten der Position Leu158 in Abhängigkeit vom Affinitätstag	135
4.2	Heterodimerisierung von <i>EcoRI</i>	145
4.3	DNA-Bindungseigenschaften der <i>Extended chain</i> -Peptide	155
4.4	Abschließende Betrachtungen zur Bedeutung der Dimerisierung für <i>EcoRI</i>	168
<b>5</b>	<b>Zusammenfassungen</b>	<b>170</b>
5.1	Zusammenfassung	170
5.2	Abstract	172
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>174</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>187</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Restriktionsendonukleasen

Als Teil von Restriktions/Modifikations-Systemen (R/M-Systemen) dienen Restriktionsendonukleasen dazu, in eine Bakterienzelle eindringende Fremd-DNA, zum Beispiel eines Bakteriophagen, durch sequenzspezifische Spaltung abzuwehren. Sie kommen in Prokaryonten vor, und können als primitives Immunsystem der Zellen angesehen werden [Wilson & Murray, 1991]. Der Restriktion wird auch evolutionäre Bedeutung zugewiesen, da die entstehenden DNA-Bruchstücke der Bakteriophagen eher durch eine homologe Rekombination in das Wirtsgenom integriert werden können als das gesamte Genom [Eggleston & West, 1997]. Das Auftreten von Restriktion und Modifikation wurde von Luria und Human (1953) entdeckt und von Arber und Dussoix (1962) aufgeklärt.

Die Restriktionsendonuklease erkennt spezifisch bestimmte DNA-Sequenzen, die anschließend gespalten werden können. Das zelleigene Genom wird durch die korrespondierende Methyltransferase geschützt, welche die gleiche Sequenz erkennt und methyliert. Dabei werden hemimethylierte DNA-Sequenzen, die infolge der DNA-Replikation in der Zelle entstehen können, bevorzugt, aber auch eine *de novo*-Methylierung ist möglich. Durch das Enzym wird ein Ringkohlenstoffatom (C5-Methylcytosin) oder ein exozyklisches Stickstoffatom (N4-Methylcytosin, N6-Methyladenin) methyliert, so daß die Transferasen in zwei Gruppen eingeteilt werden [Cheng, 1995]. Die hohe Spezifität beider Enzyme für die kognate DNA-Sequenz ist lebenswichtig für die Zelle, da andernfalls das Genom durch die Restriktionsendonuklease abgebaut würde.

R/M-Systeme werden nach der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, dem Bedarf an Kofaktoren und der spezifischen DNA-Erkennung und -Spaltung in vier Klassen unterschieden [Bickle, 1993; Heitman, 1993; Pingoud & Jeltsch, 1997]. Allen Restriktionsendonukleasen gemeinsam ist die Verwendung divalenter Kationen, gewöhnlich Magnesiumionen.

Typ I-Systeme bilden einen Enzymkomplex aus Restriktions- (R), Modifikations- (M) und Spezifitätsuntereinheit (S). Meist handelt es sich dabei um Pentamere mit der Zusammensetzung  $R_2M_2S$  (Beispiel *EcoB*) [Sturrock & Dryden, 1997]. Nach Bindung an die spezifische DNA-Sequenz findet bei Hemimethylierung die Methylierung des unmodifizierten Strangs innerhalb der Sequenz, bei einer unmethylierten Sequenz eine Spaltung in großem Abstand zur kognaten Sequenz statt. Der Enzymkomplex benötigt S-Adenosyl-Methionin (SAM) und ATP für die Reaktion.

Typ II-Systeme bestehen aus getrenntem Restriktionsenzym und Methyltransferase. Beide arbeiten an definierter Stelle überwiegend innerhalb oder nahe bei der

Erkennungssequenz. Es handelt sich meist um palindrome Tetra-, Penta-, Hexa- oder Oktanukleotidsequenzen. Dabei kommen G/C-reiche Sequenzen häufiger als A/T-reiche vor. Eine Spaltung innerhalb der Punktsymmetrie erzeugt glatte Enden (*Blunt ends*; Beispiel *EcoRV*), außerhalb entstehen 3'- oder 5'-überhängende Enden (*Sticky ends*; Beispiele *PstI* und *EcoRI*). Die Restriktionsendonuklease ist im überwiegenden Fall ein Homodimer und benötigt nur Magnesiumionen als Kofaktor. Die Methyltransferase ist ein monomeres Enzym, das für die Reaktion SAM benötigt.

Einige R/M-Systeme aus der Klasse II wurden aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften Unterklassen zugeordnet. In der Klasse IIe befinden sich Enzyme, die durch die Bindung an einer zweiten Erkennungssequenz eine allosterische Aktivierung erfahren (Beispiel *EcoRII*) [Krüger *et al.*, 1995]. R/M-Systeme monomerer Endonucleasen mit zwei Domänen (Beispiel *FokI*) wurden der Gruppe IIS zugeordnet. Sie erkennen eine asymmetrische DNA-Sequenz, wobei die Spaltung in der Nachbarschaft erfolgt [Szybalski *et al.*, 1991].

Typ III-Systeme bestehen aus einem Enzymkomplex mit je einer Untereinheit für Restriktion und Modifikation (Beispiel *EcoPI*). Die Bindung erfolgt spezifisch an die kognate asymmetrische Sequenz, die auch methyliert wird (Kofaktor SAM). DNA-Spaltung erfolgt ein bis zwei Helixwindungen in 3'-Richtung [Bickle, 1993]. Sie benötigt die Kooperation beider Untereinheiten und die Anwesenheit von ATP [Meisel *et al.*, 1995].

Typ IV-Systeme erfahren eine Stimulierung der DNA-Spaltung durch Anwesenheit von SAM, sind aber im Gegensatz zu den R/M-Systemen der Gruppe III nicht von ATP abhängig (Beispiel *Eco57I*) [Janulaitis *et al.*, 1992a; Janulaitis *et al.*, 1992b].

## 1.2 Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*

Neben *EcoRV* ist *EcoRI* die am besten untersuchte Typ II-Restriktionsendonuklease. Dabei können die Mechanismen von DNA-Erkennung, -Bindung und -Spaltung als allgemeine Modelle für spezifische DNA-Interaktionen dienen. Bekannt sind mittlerweile etwa 3200 Enzyme mit 225 Spezifitäten [Roberts & Macelis, 1999].

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* wurde zum ersten Mal 1972 beschrieben [Hedgpeth *et al.*, 1972], 1981 das Gen kloniert und sequenziert [Greene *et al.*, 1981; Newman *et al.*, 1981]. Das *EcoRI*-Monomer besteht aus 276 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 31kDa. Es entfaltet seine Spaltaktivität als dimeres Enzym gleicher Untereinheiten [Alves *et al.*, 1982] oder in Lösungen höherer Konzentration als voll spaltaktives Tetramer [Modrich & Zabel, 1976]. Darüber hinaus bilden sich Aggregate, die zu keiner DNA-Spaltung mehr fähig sind [Luke & Halford, 1993]. Die natürliche Schwerlöslichkeit ist bei einigen Mutationen ausgeprägter [Fritz, 1991; Oel-

geschläger, 1992; Engel, 1993; Grabowski, 1993].

*EcoRI*-Restriktionsendonuklease und -Methylase weisen keinerlei Sequenzhomologien auf, beide erkennen jedoch spezifisch die palindrome DNA-Sequenz GAATTC, die von der Endonuklease zwischen G und A gespalten (Pfeil) und von der Methylase am inneren Adenin am N6 methyliert wird (Me; siehe Abbildung 1.1).

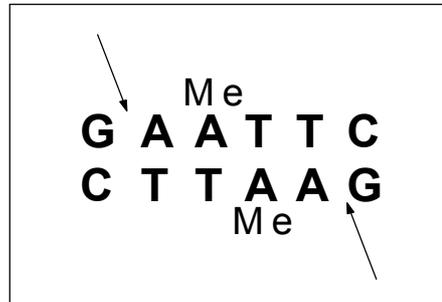


Abb. 1.1: Modifikationen an der *EcoRI*-Erkennungssequenz

Die Methylierung der Erkennungssequenz durch die Methyltransferase verhindert die vollständige Spaltung des Doppelstrangs [Jost & Saluz, 1993; McClelland *et al.*, 1994]. Eine sehr langsame Spaltung methylierter oder nicht kognater Sequenzen führt lediglich zu Einzelstrangbrüchen in der DNA [Jen-Jacobson *et al.*, 1996], die durch die zelleigene Ligase leicht repariert werden können, so daß diese Aktivität für die Zelle keine Gefahr darstellt [Taylor *et al.*, 1990].

Die Endonuklease ist in der Lage, DNA unspezifisch zu binden. Es folgt eine lineare Diffusion entlang der großen Grube, wobei die DNA auf die kognate Sequenz untersucht wird [Ehbrecht *et al.*, 1985; Jeltsch *et al.*, 1994]. Sie wird unter Standardbedingungen hochspezifisch erkannt, gebunden und in Gegenwart von Magnesiumionen gespalten. DNA-Sequenzen, die in einem Nukleotid von der kognaten Sequenz abweichen (*Star*-Sequenzen), werden um den Faktor  $10^3$  bis  $10^6$  langsamer als die spezifische DNA-Sequenz gespalten [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen relaxiert diese Genauigkeit: erhöhter pH-Wert bei gleichzeitig erniedrigtem Salzgehalt [Polisky *et al.*, 1975], Zusatz organischer Lösemittel [Goodman *et al.*, 1977] oder Verwendung von zweiwertigem Mangan statt Magnesium [Hsu & Berg, 1978]. Dabei steigt die Aktivität für *Star*-Sequenzen bis um den Faktor  $10^3$ , während die Spaltaktivität für die kognate Sequenz auf den Level der *Star*-Spaltung absinkt [Gardner *et al.*, 1982; Rosenberg & Greene, 1982].

Auch die umgebende DNA-Sequenz beeinflusst die Spaltaktivität [Alves *et al.*, 1984; Van Cleeve & Gumpert, 1992; Windolph *et al.*, 1997], so daß die fünf Erkennungssequenzen auf  $\lambda$ -DNA mit unterschiedlicher Geschwindigkeit gespalten werden [Thomas & Davis, 1975; Halford *et al.*, 1980].

Die Röntgenstruktur von *EcoRI* wurde 1986 im Komplex mit dem spezifischen Oligonukleotid dTCGCGAATTCCGCG gelöst [McClarín *et al.*, 1986]. Durch Unter-

suchungen von Schwermetallerivaten ergab sich eine revidierte Struktur, die 1990 veröffentlicht wurde [Kim *et al.*, 1990]. Sie räumte die Unstimmigkeiten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen aus. Die Struktur wurde von Rosenberg detailliert beschrieben und diskutiert [Rosenberg, 1991].

Das Homodimer zeigt im Kristall mit spezifischer DNA eine globuläre Struktur mit einem Durchmesser von 5nm. Die DNA wird vollständig von dem Enzym umschlossen (mit den Strukturen des sogenannten *Inner arm* und *Outer arm*), wobei die DNA eine Aufwindung der großen Grube erfährt (siehe Abbildung 1.2).

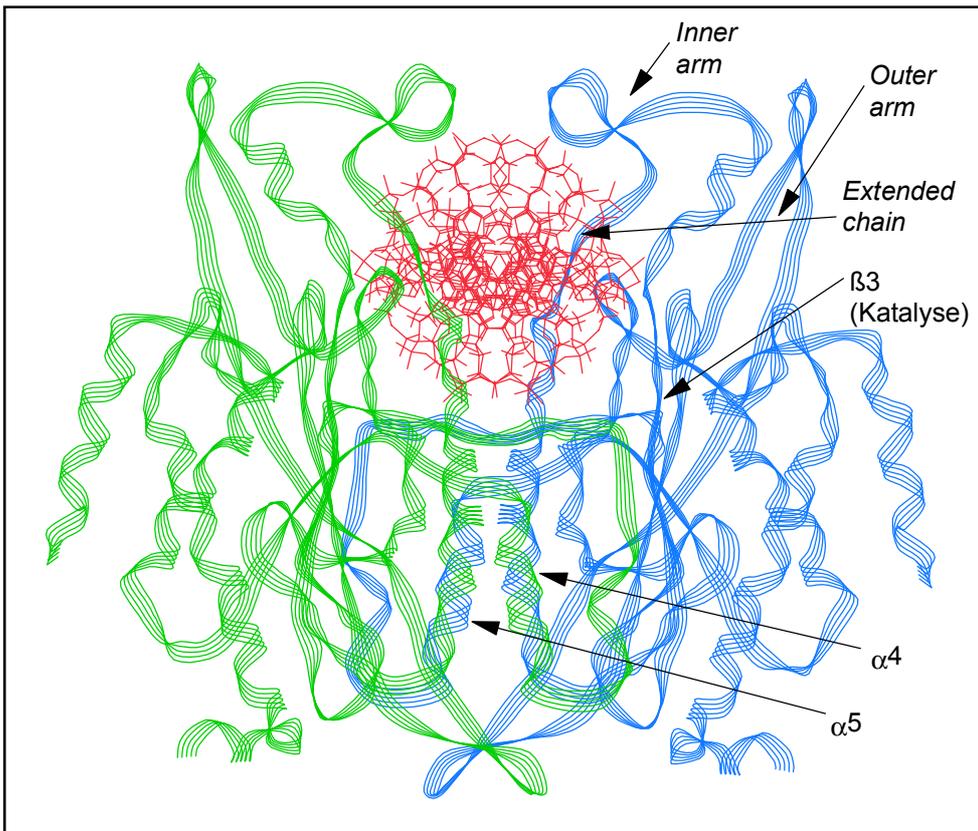


Abb. 1.2: Bändermodell der dimeren *EcoRI* im Komplex mit der DNA

Als zentrales Strukturmotiv enthält jede Untereinheit ein fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt und vier  $\alpha$ -Helices. Die Faltblätter  $\beta 1$  und  $\beta 3$  sind antiparallel ausgerichtet. Sie enthalten die katalytisch wichtigen Aminosäurereste Asp91, Glu111 und Lys113.

$\beta 3$  und  $\beta 5$  bilden zusammen mit den Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  ein  $\alpha/\beta$ -Bindungsmotiv, das der in vielen Dehydrogenasen vorkommenden nukleotidbindenden Rossmann-Falte ähnelt [Rossman *et al.*, 1975]. Die innere ( $\alpha 4$ ) und die äußere ( $\alpha 5$ ) Erkennungshelix bilden im Homodimer ein Vier-Helix-Bündel mit einem Dipolmoment, das auf die DNA gerichtet ist.

### 1.2.1 Unspezifische DNA-Bindung und lineare Diffusion

Die kognate Hexanukleotidsequenz ist mit 1:4095 gegen unspezifische Hexanukleotide deutlich unterrepräsentiert, so daß die Interaktion der Restriktionsendonuklease meist mit unspezifischer DNA beginnt. Die diffusionskontrollierte Assoziation des Enzyms an die DNA ist elektrostatischer Natur und damit von der Ionenstärke der umgebenden Lösung abhängig [Alves *et al.*, 1989].

Die DNA wird bei der Bindung durch das Enzym von den Strukturen des *Inner arm* (Aminosäuren 124-136) und *Outer arm* (Aminosäuren 176-193) umschlossen. Dies setzt Beweglichkeit des Proteins voraus, da es sich vor der Bindung öffnen muß. Eine Dimerisierung der Untereinheiten erst auf der DNA kann ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, daß das Enzym auch in DNA-freier Lösung als Homodimer vorliegt [Modrich & Zabel, 1976]. Die unspezifische Bindung in Abwesenheit von Magnesium ist möglich aber schwach ( $K_{\text{ass}} \approx 10^5$  [Langowski *et al.*, 1980; Terry *et al.*, 1985]). Im Gegensatz dazu erfolgt die Bindung spezifischer Sequenzen mit hoher Affinität ( $K_{\text{ass}} \approx 5 \cdot 10^8$  [Grabowski *et al.*, 1995]). Ein vergleichbarer Kokristall mit *EcoRI* in Bindung unspezifischer DNA existiert nicht, Bindungsdaten legen jedoch eine Analogie zu *EcoRV* nahe. Diese Röntgenstruktur im Komplex mit einer unspezifischen DNA zeigt lediglich fünf Kontakte zwischen Aminosäureresten und den Phosphatgruppen der DNA [Winkler *et al.*, 1993; Kostrewa & Winkler, 1995]. Direkte Kontakte zu den Basen sind nicht zu erkennen, und auch durch Zusatz zweiwertiger Kationen nicht induzierbar [Selent *et al.*, 1992; Vipond *et al.*, 1995].

Nach der unspezifischen Bindung folgt *EcoRI* den Windungen der großen Grube der DNA [Jeltsch *et al.*, 1994a]. Diese lineare Diffusion erfolgt mit einer Geschwindigkeit von  $7 \cdot 10^6$  Basenpaaren in der Sekunde [Ehbrecht *et al.*, 1985]. Dabei ist ein Gleichgewicht zwischen abstoßenden und anziehenden Kräften zwischen Enzym und DNA entscheidend, um eine optimale Diffusion zu erreichen. Es handelt sich nicht um eine gleichmäßig Bewegung, vielmehr ist sie auch von der konkreten DNA-Sequenz und -Struktur abhängig. *Star*-Sequenzen werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit deutlich fester gebunden [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990] und bewirken eine Pause der Diffusion mit einer Verweildauer von bis zu 20 Sekunden, die jedoch in den meisten Fällen nicht zu einer Spaltung führt [Jeltsch *et al.*, 1994a].

Die Bedeutung der linearen Diffusion liegt in der Notwendigkeit begründet, daß die Restriktionsendonuklease beim Eindringen einer Fremd-DNA die spezifische Sequenz schnell finden muß, bevor die Methyltransferase die entsprechenden Stellen schützt. Für Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRV*, die in ihrer Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat gestört sind, konnte neben einer reduzierten Fähigkeit, eindringende DNA abzuwehren, nur eine Beeinflussung der linearen Diffusion festgestellt werden [Jeltsch *et al.*, 1996]. Die Spaltaktivität ist unbeeinflusst und für die Abwehr eindringender Bakteriophagen offenbar von untergeordneter Bedeutung im Gegensatz zum schnellen Auffinden der spezifischen Sequenz.

## 1.2.2 Spezifische DNA-Bindung und Kopplung zur Katalyse

In einer wäßrigen Lösung weist die *EcoRI*-Erkennungssequenz die Konformation einer B-DNA auf [Lane *et al.*, 1991]. Die Bindung durch das Enzym führt zu einer Veränderung des Basenrollwinkels und der AT-Konformation (*Type 1 neokink*): Die DNA knickt im Zentrum der Erkennungssequenz und entwindet sich dabei um 28°. Dabei erfolgt eine Öffnung der großen Grube um 0,35nm [Rosenberg, 1991]. Dies macht die Einlagerung der Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  und der *Extended chain* (Aminosäuren 137-142) beider Untereinheiten möglich. Dies ist der initiale Schritt zur spezifischen Bindung.

Die *Extended chain* wird durch das Vier-Helix-Bündel und die antiparallele Faltblattstruktur fixiert, lagert sich parallel zur großen Grube in die DNA ein und bildet eine Vielzahl von basenspezifischen Wechselwirkungen aus. Es konnte gezeigt werden, daß ein Peptid, das aus den Aminosäuren der *Extended chain* besteht, in der Lage ist, schwach aber spezifisch die kognate *EcoRI*-Sequenz zu binden [Jeltsch *et al.*, 1995b].

Das  $\beta 3$ -Faltblatt, das die katalytischen Aminosäuren Glu111 und Lys113 sowie die für die Kopplung wichtigen Aminosäuren Gln115 und Lys117 trägt, richtet sich parallel zum Phosphatrückgrat aus. Dabei koordinieren Asp91 und Glu111 das für die Katalyse essentielle Magnesiumion, während Lys113 eine Wasserstoffbrückenbindung zum zu spaltenden Phosphat aufbaut. Die Strukturen des *Inner* und *Outer arms* bilden zusätzliche Kontakte zu den Phosphatgruppen außerhalb der Erkennungssequenz aus [Rosenberg, 1991].

Eine zentrale Rolle kommt der Aminosäure Glu144 zu, die für eine Vernetzung der Untereinheiten sorgt. Sie bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn141 und Arg203 der eigenen Untereinheit und Arg145 sowie Lys148 der anderen Untereinheit aus.

Nach Rosenberg werden bei der spezifischen DNA-Bindung insgesamt 14 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und Purinbasen ausgebildet, vier weitere zu den Pyrimidinbasen. Der Kontakt zum Guanin wird über ein Wassermolekül von den Aminosäuren Arg200 und Arg203 hergestellt. Außerdem gibt es eine Reihe von van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA (hydrophobe Kontakte von Gln115, Met137, Gly140 und Ala142) [Rosenberg, 1991].

Abbildung 1.3 zeigt schematisch die gebildeten Kontakte zur spezifischen DNA.

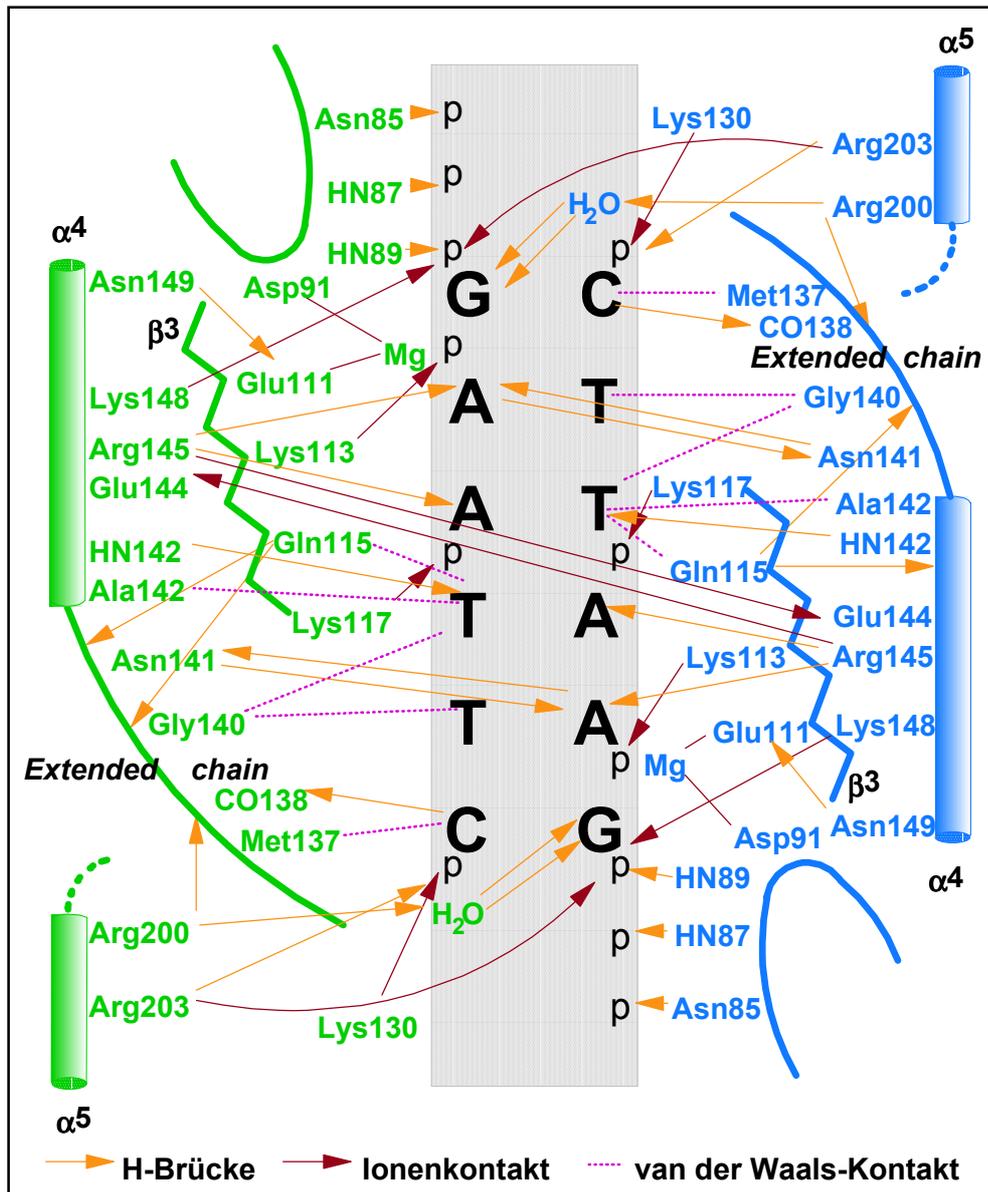


Abb. 1.3: Schematische Darstellung aller Kontakte der dimeren *EcoRI* zur kognaten Sequenz GAATTC

Zunächst wurde angenommen, daß die spezifische DNA-Bindung von Restriktionsendonukleasen nicht von der Anwesenheit divalenter Kationen abhängig ist (zum Beispiel *EcoRI* und *BamHI*). Allerdings häuft sich die Anzahl der Endonukleasen, die nur in Gegenwart solcher Ionen spezifisch DNA zu binden vermögen: *EcoRV* [Vipond & Halford, 1995; Engler *et al.*, 1997], *Cfr9I* [Siksnyš & Plekaityte, 1993], *MunI* [Lagunavicius *et al.*, 1997], *PaeR7* [Ghosh *et al.*, 1990], *TaqI* [Zebala *et al.*, 1992]. Auch einige *EcoRI*-Mutanten [Windolph *et al.*, 1997] bedürfen zweiwertiger Ionen für eine spezifische Bindung.

Durch die strukturelle Adaption von Enzym und DNA (*Induced fit*), die bei der spezifischen DNA-Bindung stattfindet, werden eine Vielzahl von Bindungen ausgebildet, die den spezifischen Komplex gegenüber der Bindung unspezifischer DNA energetisch begünstigen. Die zentralen Basenpaare weisen keine *Stacking*-Wechselwirkungen mehr auf und die zu spaltende Bindung befindet sich in einer optimalen Posi-

tion für eine Spaltung durch die katalytischen Aminosäuren. Es ergibt sich somit eine direkte Verknüpfung der Erkennung der kognaten Sequenz im spezifischen Komplex mit ihrer Spaltung.

Die Summe der ausgebildeten Bindungen zwischen Protein und DNA lassen den Schluß zu, daß es sich um eine redundante Erkennung handelt. Tatsächlich konnte durch die Untersuchung von Mutanten bewiesen werden, daß die Entfernung eines oder mehrerer Kontakte nicht zu einer Veränderung der Sequenzspezifität führt, jedoch in den meisten Fällen zu einem Verlust von Spaltaktivität [Wolfes *et al.*, 1986; Yanofsky *et al.*, 1987; Geiger *et al.*, 1989; Alves *et al.*, 1989a; Needles *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989; Osuna *et al.*, 1991; Selent *et al.*, 1992; Jeltsch *et al.*, 1993a; Flores *et al.*, 1995]. Dies spricht für eine strikte Kopplung von Erkennung und Spaltung.

Die Analyse des Spaltverhaltens von *Star*-Sequenzen ergibt ein analoges Bild: Während die Bindungskonstante für die kognate Sequenz nur um den Faktor 100-1000 größer ist, liegt die intrinsische Geschwindigkeitskonstante für die Spaltung der kanonischen Sequenz gegenüber der *Star*-Spaltung um  $10^5$  bis  $10^6$  höher, so daß sich eine effektive Diskriminierung von *Star*-Sequenzen ergibt [Lesser *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1990]. Zusätzlich spielt das Assoziations- und Dissoziationsverhalten des Enzyms eine Rolle: Bei der kanonischen Sequenz erfolgt nach Spaltung eines Strangs (*Nicking*) wahlweise die Spaltung des anderen Strangs oder eine Abdissoziation des Enzyms [Langowski *et al.*, 1980; Alves *et al.*, 1989b]. Bei der Spaltung von *Star*-Sequenzen erfolgt die Abdissoziation in jedem Fall, so daß es der Zelle möglich ist, den vorliegenden Einzelstrangbruch mit Hilfe einer Ligase zu reparieren. Für *EcoRV* wurde dies *in vivo* gezeigt [Taylor *et al.*, 1990]. *In vitro* kann die *Star*-Aktivität dieses Enzyms durch die Zugabe von Ligase unterdrückt werden [Taylor & Halford, 1989].

Der Austausch einiger Aminosäuren, die nicht direkt an der Katalyse oder Bindung beteiligt sind, sondern Substrukturen des Enzyms verbinden, führen zu einer Störung in der Kommunikation zwischen diesen Teilen des Enzyms, und der Kopplungsprozeß zwischen spezifischer Bindung und Spaltung ist stark gestört [Jeltsch *et al.*, 1993a]. Ein Teil dieser Kopplung ist die Aminosäure Gln115. Sie bildet hydrophobe Wechselwirkungen über die  $\beta$ -Methylgruppe zum Thymin der Erkennungssequenz und viele intramolekulare Kontakte aus. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen werden zum Peptidrückgrat der *Extended chain* ausgebildet. Da sich Gln115 wie die katalytischen Aminosäuren im  $\beta$ 3-Faltblatt befindet, ist eine Anbindung an die Katalyse wahrscheinlich.

### 1.2.3 Katalyse

Die DNA-Spaltung durch *EcoRI* erfolgt mittels Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des Rückgrats durch aktiviertes Wasser in Form einer  $S_N2$ -Reaktion [Connolly *et al.*, 1984]. Mehrere Komponenten sind für die Spaltung nötig: eine Lewisäure für die Erhöhung der Elektrophilie des Phosphoratoms, eine Base für die Aktivierung des hydrolysierenden Wassers, Kompensation der negativen Ladung im Übergangszustand und die Protonierung der Fluchtgruppe.

Die Röntgenstruktur konnte nur ohne das für die Spaltung wichtige Magnesium gelöst werden, zusammen mit den Ergebnissen aus biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen ergibt sich ein detailliertes Bild. So wurde 1992 der Mechanismus der substratunterstützten Katalyse für *EcoRI* und *EcoRV* postuliert [Jeltsch *et al.*, 1995a] (siehe Abbildung 1.4).

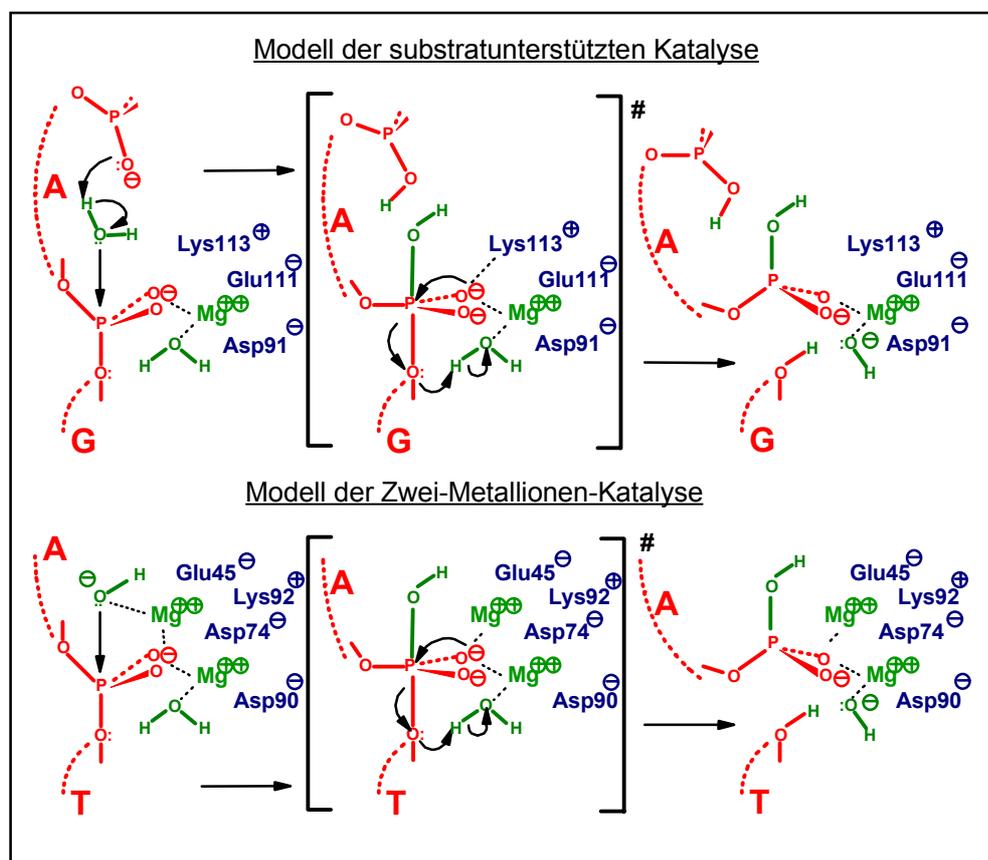


Abb. 1.4: Modell der substratunterstützten Katalyse [Jeltsch *et al.*, 1992] und der Zwei-Metallionen-Katalyse [Kostrewa & Winkler, 1995]

Bei der substratunterstützten Katalyse erfolgt die Aktivierung des Wassers durch den pro-R<sub>P</sub>-Phosphorylsauerstoff der Phosphatgruppe am 3'-Ende der zu spaltenden Bindung. Durch Spaltexperimente mit modifizierten Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, daß er essentiell für die Spaltung ist. Substrate, denen diese Gruppe fehlte, wurden nur im Gegenstrang gespalten. Bei Ersatz dieser Gruppe durch H-Phosphonate erfolgte eine um den Faktor 10<sup>4</sup> langsamere Spaltung. Bei der Reaktion mit

Phosphothioaten fand nur dann eine vollständige Spaltung statt, wenn das negativ geladene Schwefelatom an der oben beschriebenen Position saß [Jeltsch *et al.*, 1993b]. Die Bedeutung der Ladung konnte für *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII* nachgewiesen werden [Jeltsch *et al.*, 1995a].

Das aktivierte Wasser kann die Phosphatgruppe in Richtung der zu lösenden Phosphatbindung angreifen. Die Hydrolyse auf der 3'-Seite ergibt somit ein 5'-Phosphat, wobei die Phosphatgruppe einer Inversion unterliegt [Connolly *et al.*, 1984].

Die Aminosäuren Asp91 und Glu111 positionieren dabei das Magnesiumion gegenüber der zu spaltenden Bindung [Jeltsch *et al.*, 1992]. Dies bewirkt eine Polarisierung der nicht zum DNA-Rückgrat gehörenden P-O-Bindung des Phosphats und erhöht somit die Elektrophilie des Phosphoratoms. Ein Sauerstoff des Phosphats kann in die Koordinationssphäre des Magnesiums aufgenommen werden und schafft einen Ausgleich für die zusätzliche negative Ladung des trigonal pyramidalen Übergangszustandes [Heitman, 1993]. Zusätzlich wird die negative Ladung durch die basische Aminosäure Lys113 neutralisiert. Nach der Spaltung der Phosphodiesterbindung protoniert ein Wassermolekül aus der Koordinationssphäre des Magnesiums die Fluchtgruppe.

Für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* existiert im Gegensatz zu *EcoRI* ein Protein/DNA-Kokristall mit zweiwertigen Metallionen [Winkler *et al.*, 1993]. Durch die auftretenden Elektronendichten konnten zwei Metallionenbindungsstellen lokalisiert werden: zwischen den Aminosäuren Asp74/Asp90 und zwischen Glu45/Asp74, wobei die letztgenannte eine geringere Elektronendichte aufwies und nicht immer alle Kriterien für eine Magnesiumbindungsstelle erfüllte. Allerdings konnte die Existenz einer zweiten Bindungsstelle experimentell nachgewiesen werden: In Gegenwart von Manganganionen konnte die Spaltgeschwindigkeit durch Zusatz von Kalziumionen erhöht werden, obwohl Kalzium allein die Reaktion nicht vermitteln kann [Vipond *et al.*, 1995]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Zwei-Metallionen-Mechanismus als Alternative zur substratunterstützten Katalyse postuliert [Kostrewa & Winkler, 1995; Vipond *et al.*, 1995] (siehe Abbildung 1.4). In diesem Mechanismus stammt das angreifende Wasser aus der Hydrathülle des einen Metallions und wird durch dieses aktiviert, wobei das zweite auch hier die zu spaltende Bindung polarisiert.

Der molekulare Verlauf der Spaltung ist noch nicht vollständig geklärt, es sprechen jedoch einige Punkte gegen den Zwei-Metallionen-Mechanismus. Zum einen konnte die mögliche zentrale Rolle des Glu45 durch zielgerichtete Mutagenese widerlegt werden [Selent *et al.*, 1992; Jeltsch *et al.*, 1996]. Zum anderen scheint es unmöglich, daß das angreifende Wasser aus der Hydrathülle des zweiten Ions zwischen Glu45 und Asp74 stammt, da es um 0,89nm von der Phosphodiesterbindung entfernt ist.

## 1.2.4 Bedeutung der Dimerisierung für *EcoRI*

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* bildet als Homodimer eine globuläre Struktur mit minimaler Oberfläche. Die Kontaktfläche der Untereinheiten ist hydrophober Natur. Die Dimerisierung des Enzyms ist stark bevorzugt, da sie diese Bereiche im Innern verbirgt und nur die hydrophilen Aminosäurereste dem umgebenden Wasser zuwendet. Ein Austausch von Untereinheiten ist nur über einen Zeitraum von Tagen zu beobachten und für eine Bakterienzelle *in vivo* nicht von Bedeutung [Jeltsch, 1994].

Die Interaktionsfläche wird durch eine Reihe hydrophober Aminosäuren gebildet, die sich in den Sekundärstrukturelementen  $\alpha 4$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta V$  und  $\beta VI$  befinden (vergleiche auch Abbildung 1.2). Es ist bekannt, daß *EcoRI* in höheren Konzentrationen Tetramere bildet [Modrich & Zabel, 1976]. Die Zuordnung dieser zweiten Kontaktfläche ist in der Kokristallstruktur nicht möglich. Ein hydrophober Kontakt scheint jedoch unwahrscheinlich, da diese Aminosäurereste im Dimer dem umgebenden Wasser zugewandt sein müßten.

Bei Bindung der Erkennungssequenz findet sich die Symmetrie des palindromen Substrates in der homodimeren Struktur der Endonuklease wider. Hinführend zu der Aminosäure Arg145, an der sich die beiden Untereinheiten auf 6,1Å nahe kommen, erstreckt sich die *Extended chain* durch die große Grube der DNA, um die Vielzahl der direkten und indirekten Kontakte zur Erkennungssequenz auszubilden. Auch zwischen den Untereinheiten wird ein Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen aufgebaut: Die Aminosäure Glu144 kontaktiert Asn141 und Arg203 derselben Untereinheit sowie Arg145 und Lys148 der anderen Untereinheit. Eine zentrale Rolle wird der Aminosäure Gln115 zugewiesen, die mit den katalytisch aktiven Aminosäuren im gleichen  $\beta$ -Faltblatt steht und durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rückgrat der *Extended chain* verbunden ist, die einen Großteil der Erkennung leistet. Die Vermittlung zwischen beiden Untereinheiten könnte auch durch die Aminosäure Glu111 geschehen, da sie der Dimerisierungsfläche nahe steht und in der Katalyse eine entscheidende Rolle spielt.

Es gibt Hinweise, daß die Kontrolle von Erkennung und Spaltung über das Zusammenwirken beider Untereinheiten erfolgt [Thielking *et al.*, 1990]. Experimente mit *Mismatch*-Oligonukleotiden haben gezeigt, daß die Erkennung der spezifischen Sequenz durch eine Untereinheit gerade die andere zur Spaltung veranlaßt. Eine Untereinheit befindet sich in Kontakt mit beiden DNA-Strängen, spaltet jedoch nach den gefundenen Daten den DNA-Strang, zu dem sie weniger Kontakte ausbildet. An der Auslösung der Spaltung der Erkennungssequenz sind daher beide Untereinheiten beteiligt.

Monomere Enzyme, zum Beispiel Asp199-Mutanten [Geiger, 1990] oder L158D [Vennekohl, 1996], können nur noch einen DNA-Strang spalten, da nur ein katalytisches Zentrum vorhanden ist. Sie werden dadurch zu *Nicking*-Mutanten. Eine spezifische Erkennung der kognaten Sequenz ist nicht länger möglich. Selbst die unspezi-

fische Bindung von DNA ist stark beeinträchtigt, da ein Umfassen der DNA und damit ihre Fixierung nicht ausreichend stattfinden kann (siehe Abbildung 1.5).

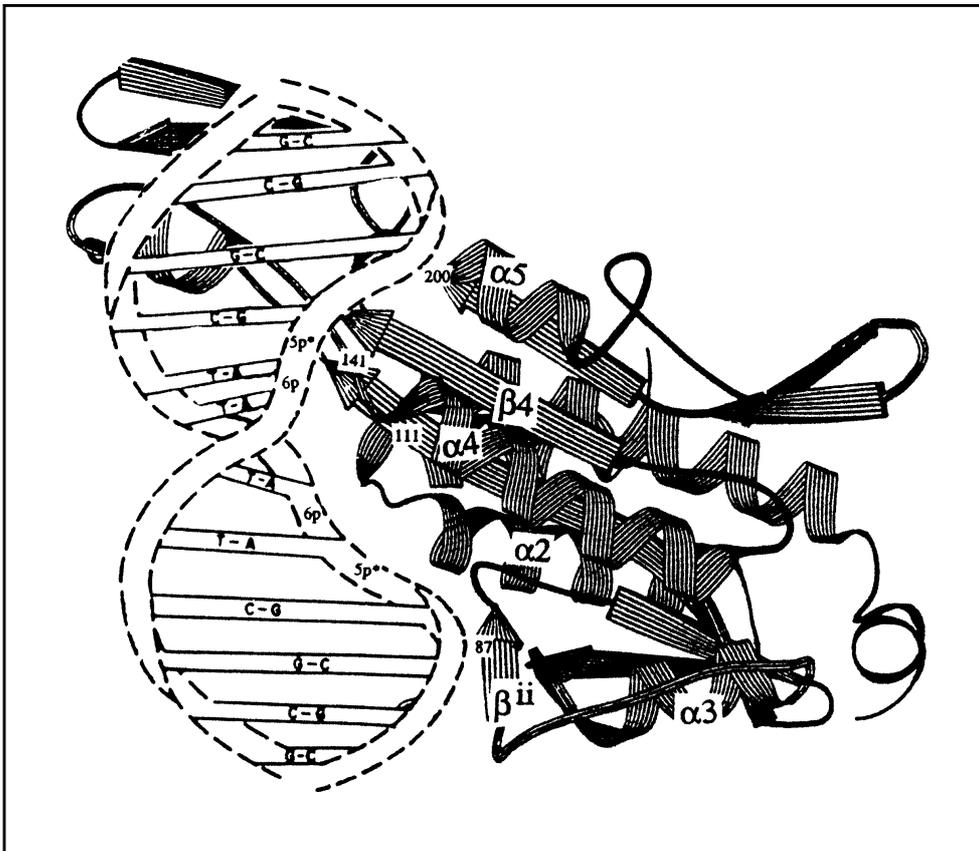


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Peptidrückgrates einer Untereinheit der *EcoRI* mit DNA [Rosenberg, 1991]

Abbildung 1.5 zeigt das Peptidrückgrat einer Untereinheit aus dem Kokristall der dimeren Restriktionsendonuklease *EcoRI*. Tatsächlich muß jedoch davon ausgegangen werden, daß die Sekundärstrukturelemente nicht in dieser Form vorliegen, sondern eine flexiblere Struktur aufweisen. Experimente mit der Mutante L158D (Circular dichroismus-Spektroskopie) zeigen kein eindeutiges Vorhandensein einer Sekundärstruktur [Vennekohl, 1996]. Vermutlich werden hydrophobe Proteinanteile durch eine Konformationsänderung in eine weniger exponierte Position gebracht. Es handelt sich jedoch nicht um eine irreversible Umstrukturierung, da die Mutante noch immer in der Lage ist, mit der korrespondierenden Mutante I230K Heterodimere zu bilden.

### 1.3 Vergleich von *EcoRI* mit Restriktionsendonukleasen bekannter Kristallstruktur

Im Gegensatz zu den Methylasegenen, die eine ausgeprägte Sequenzhomologie aufweisen [Cheng, 1995; Pingoud & Jeltsch, 1997], zeigen die Restriktionsendonukleasegene mit Ausnahme einiger Iso- und Neoschizomere keine Homologien. Klassische DNA-Bindungsmotive wie *Helix-turn-helix*- oder basische *Helix-loop-helix*-Strukturen, Zink-Finger oder basischer *Zipper* kommen nicht vor [Pingoud & Jeltsch, 1997]. Es zeigen sich jedoch signifikante strukturelle Übereinstimmungen bei der Betrachtung von Teilbereichen, die funktionell ähnlich sind [Siksnys *et al.*, 1995].

Es sind Kristallstrukturen von sieben Restriktionsendonukleasen bekannt. Tabelle 1.1 faßt einige Eigenschaften zusammen.

Tab. 1.1: Typ II-Restriktionsendonukleasen bekannter Struktur

Restriktionsendonuklease	Autoren	Anzahl Aminosäuren	Erkennungssequenz
<i>EcoRI</i>	Kim <i>et al.</i> , 1990	276	G↓AATTC
<i>EcoRV</i>	Winkler <i>et al.</i> , 1993	245	GAT↓ATC
<i>BamHI</i>	Newman <i>et al.</i> , 1994	213	G↓GATCC
<i>PvuII</i>	Athanasiadis <i>et al.</i> , 1994	157	CAG↓CTG
<i>Cfr10I</i>	Bozic <i>et al.</i> , 1996	285	Pu↓CCGGPy
<i>FokI</i>	Wah <i>et al.</i> , 1997	583	GGATGN <sub>9</sub> /N <sub>14</sub>
<i>BglI</i>	Newman <i>et al.</i> , 1998	299	GCCNNNN↓NGGC

Bei *EcoRV* und *PvuII* handelt es sich um Enzyme, die glatte Enden an der DNA erzeugen, während die anderen Restriktionsendonukleasen nach der Spaltung überhängende Ende zurücklassen. Die Enzyme weisen eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit auf. Abbildung 1.6 stellt die Strukturen der Restriktionsendonuklease ohne (*Cfr10I*) oder im Komplex mit DNA dar.

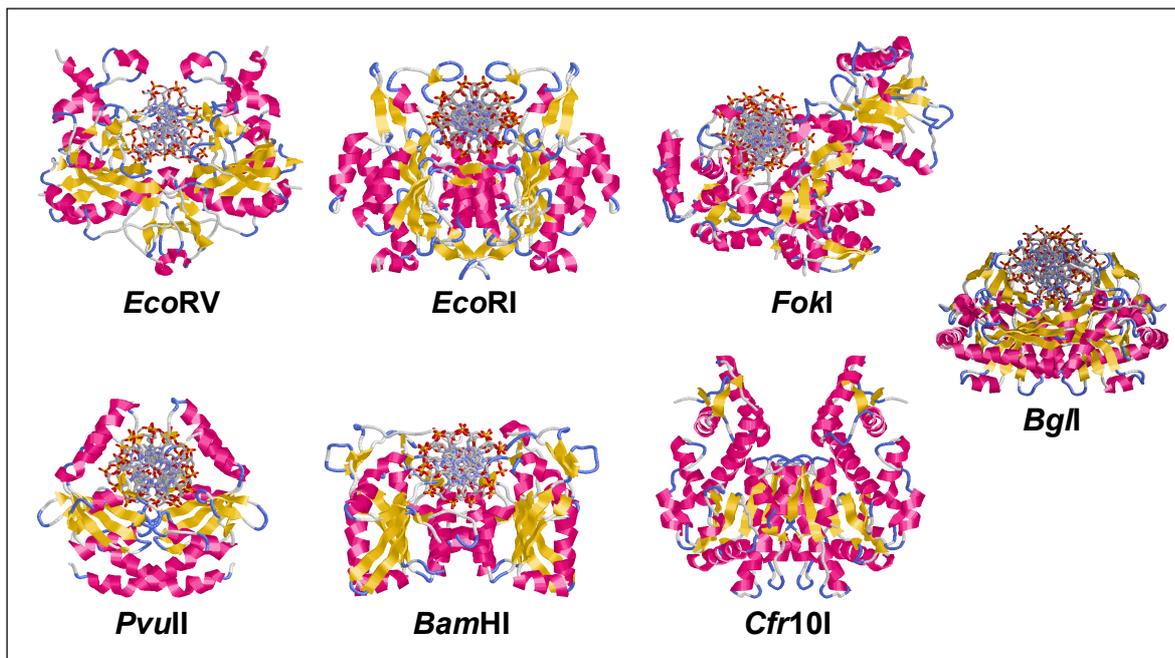


Abb. 1.6: Vergleich der Strukturen von Restriktionsendonukleasen im Komplex mit und ohne DNA

Für diese Restriktionsendonukleasen konnte ein zentrales Strukturmotiv aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das die Aminosäuren des aktiven Zentrums enthält, nachgewiesen werden. Die katalytisch aktiven Aminosäuren befinden sich am Beginn des zweiten und am Ende des dritten Faltblattes (vergleiche auch Abbildung 1.7).

Sinnvollerweise lassen sich die Enzyme in zwei Gruppen unterscheiden. Während *EcoRV* und *PvuII* die DNA-Spaltung von der kleinen Grube her einleiten, nähern sich die anderen Enzyme der DNA von Seiten der großen Grube. Der Unterschied liegt hierbei in der relativen Position der zu spaltenden Phosphodiesterbindung innerhalb der Erkennungssequenz. Die kognate Sequenz ist bei der Erzeugung eines 5'-Überhangs nur von der großen Grube zugänglich, während die Spaltung von DNA zu glatten Enden (*EcoRV* und *PvuII*) aus der kleinen Grube geschehen kann [Anderson *et al.*, 1993].

Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Gruppen werden beim Vergleich der Topologien der Enzyme deutlicher. In Abbildung 1.7 sind die Sekundärstrukturelemente von *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV* und *PvuII* dargestellt.

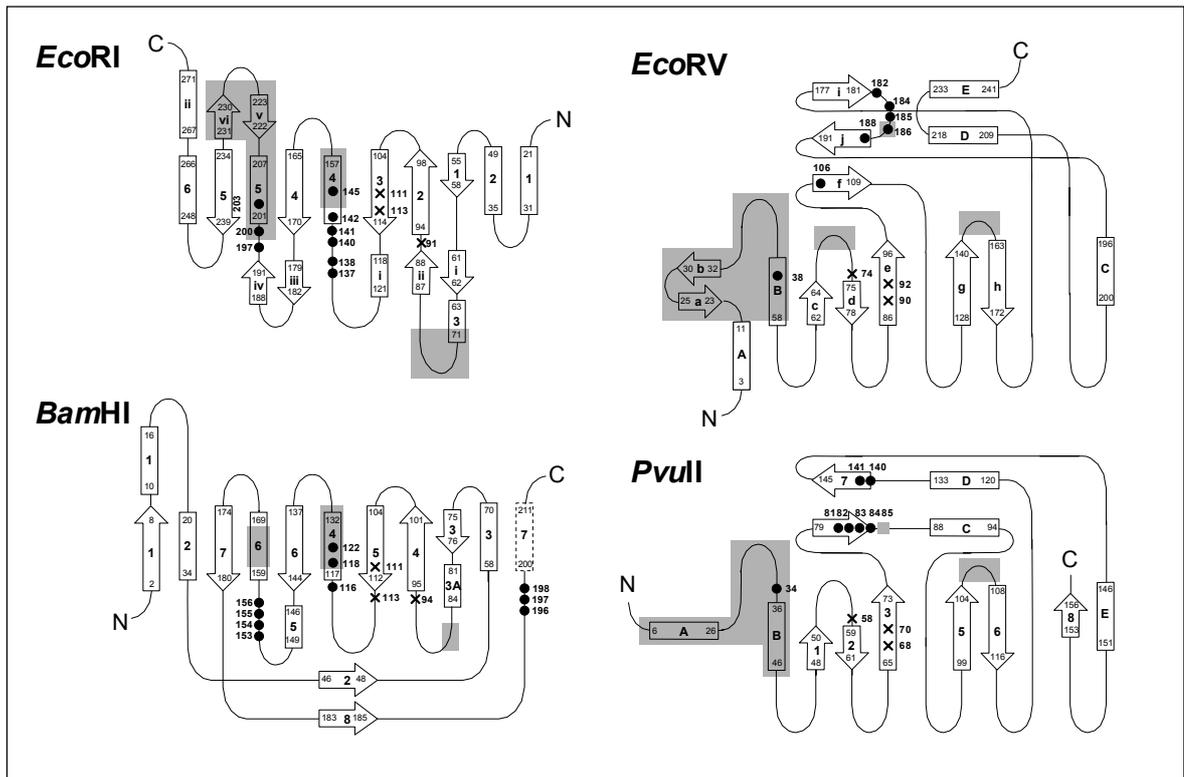


Abb. 1.7: Vergleich der Topologien von *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* und *PvuII* [basierend auf Newman *et al.*, 1994 und Athanasiadis *et al.*, 1994] (x: an der Katalyse beteiligte Aminosäure, •: an der Erkennung von Basen der kognaten Sequenz beteiligte Aminosäure, graue Bereiche: Dimerisierungskontakte)

Die Strukturen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* weisen eine so große strukturelle Ähnlichkeit auf, daß ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vermutet wird [Newman *et al.*, 1994]. Beide verwenden ein Vier-Helix-Bündel sowohl für die DNA-Erkennung als auch für die Dimerisierung.

Dennoch existieren wesentliche Unterschiede zwischen den Enzymen: Bei der spezifischen DNA-Erkennung durch *EcoRI* tritt im zentralen AATT-Motiv ein Knick von 28° auf. Dadurch werden die *Stacking*-Wechselwirkungen zwischen den Basen aufgehoben, und die große Grube wird für die Spaltung zugänglicher (vergleiche 1.2.2). Im Gegensatz dazu tritt bei der spezifischen DNA-Bindung durch *BamHI* keine Verzerrung der DNA auf, obwohl sie durch zwei  $\alpha$ -Helices und eine angrenzende Schleife (analog zu *EcoRI*) erkannt und gebunden wird. Vergleichbare Strukturen zu *Inner* und *Outer arm* oder zum *Extended chain*-Motiv existieren in der *BamHI* nicht. Dafür wird in diesem Enzym zusätzlich eine C-terminal angeordnete  $\alpha$ -Helix nur einer Untereinheit in die kleine Grube der DNA eingelagert. So erkennt *BamHI* die DNA über Kreuz: Es werden die Basen eines Strangs und das Phosphatrückgrat des jeweils anderen Strangs kontaktiert.

Dagegen erreicht *EcoRV* die DNA-Erkennung durch verschiedene Schleifenstrukturen. Das Hauptmotiv ist die Erkennungsschleife (*R-loop*), die zwölf von 18 direkten Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Zusätzlich werden zwei van der Waals-Kontakte und zwölf indirekte (durch Wasser vermittelte) Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Ein weiterer Teil der Kontakte wird durch eine glutaminreiche

Schleife (*Q-loop*) erreicht, die vier Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen der kleinen Grube bildet und die katalytisch wichtige Aminosäure Asp74 enthält. Während der spezifischen Bindung entsteht bei *EcoRV* ein komplexes Netzwerk von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakten, bei der die DNA um 55° entwunden wird, wobei die kleine Grube aufgewunden und die große verengt wird.

*PvuII* weist zum Teil große Ähnlichkeit zu *EcoRV* auf, jedoch tritt hier keine Verzerrung der DNA in der spezifischen Bindung auf. Als Erkennungsmotiv dient ein zweisträngiges, antiparalleles Falblatt mit zwölf direkten Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakten zu Basen und Phosphatrückgrat.

Trotz der unterschiedlichen Strategien der DNA-Kontaktierung zeigt der Vergleich der aktiven Zentren der Restriktionsendonukleasen in der Superposition der katalytischen Aminosäuren eine hohe Homologie (siehe Abbildung 1.8), die eine Ähnlichkeit im Katalysemechanismus impliziert. Weiterhin lassen sich ähnliche Organisationen in anderen DNA-modifizierenden Enzymen finden, zum Beispiel der  $\lambda$ -Exonuklease oder dem Reparaturenzym MutH.

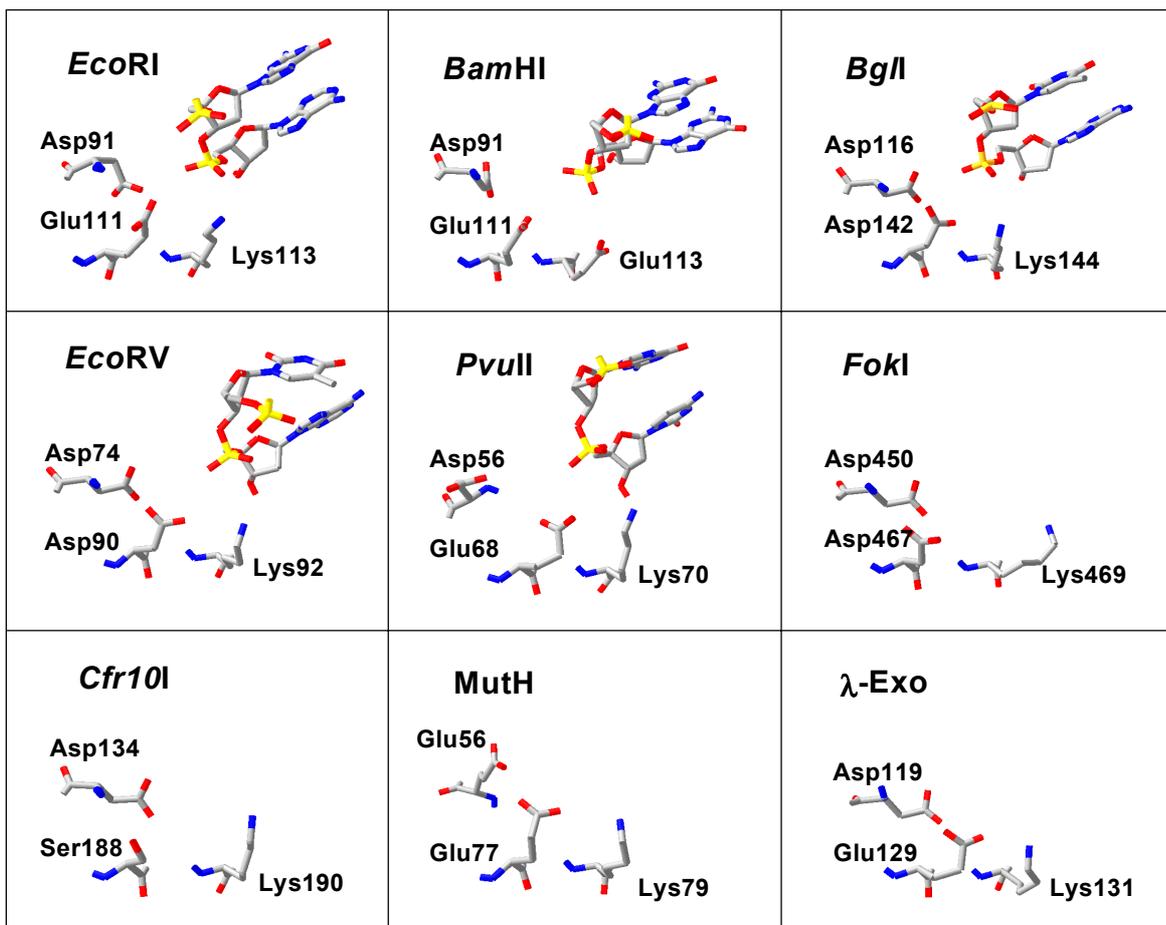


Abb. 1.8: Strukturelle Homologien der katalytischen Zentren der Restriktionsendonukleasen bekannter Kristallstruktur und anderer DNA-modifizierender Enzyme

Ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt enthält das katalytische Zentrum. Dabei handelt es sich in der überwiegenden Zahl um zwei saure und eine basische Aminosäure (Ausnahme *Bam*HI mit drei sauren Aminosäuren und *Cfr*10I mit einem Serin statt einer sauren Aminosäure). Daher wurde für das katalytische Zentrum von Restriktionsendonukleasen ein allgemein gültiges Sequenzmotiv der Zusammensetzung PDX<sub>9</sub>-<sub>18</sub>(E/D)ZK ermittelt [Selent *et al.*, 1992]. Dabei ist X eine beliebige Aminosäure, während Z einen hydrophoben Rest darstellt. Das Auftreten dieses Motivs ist jedoch nicht unbedingt indikativ, da es in *Eco*RI zweifach vorkommt, die Restriktionsendonuklease jedoch nur ein katalytisches Zentrum aufweist.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die Untersuchungen zum Dimerisierungszustand der Restriktionsendonuklease *Eco*RI sind in der Diplomarbeit begonnen worden [Vennekohl, 1996] und werden mit dieser Arbeit fortgeführt. Im besonderen sollen die Hinweise auf den monomeren Zustand der Mutante L158D untermauert und eine Charakterisierung der Nicking-Eigenschaft des Enzyms durchgeführt werden.

Weiterhin bietet die gezielte Destabilisierung der Interaktionsfläche zwischen den Proteinteilen die Möglichkeit, das bekannte Gebiet des homodimeren Enzyms zu verlassen, und Untersuchungen zur Kooperation der Untereinheiten in einem heterodimeren Protein fortzusetzen. Dazu sollen auch andere Verfahren der Bildung von heterodimeren Enzymen erprobt werden (zum Beispiel Koexpression in der Bakterienzelle).

Der Aggregationszustand der Restriktionsendonuklease *Eco*RI ist in hohem Maße vom Affinitätstag abhängig, der zur Aufreinigung des wt-Enzyms und der Mutanten verwendet wird. In diesem Zusammenhang ist die Klonierung und Charakterisierung eines Fusionsproteins mit einem weiteren Affinitätstag (*Strep*Tag II) angestrebt, bei dem eine Verstärkung der Aggregationsneigung durch die Diversität der Aminosäuren weniger wahrscheinlich ist.

Die Symmetrie der palindromen Erkennungssequenz findet sich nicht nur in der homodimeren Proteinstruktur wider, sondern auch in der Anordnung des zentralen Erkennungsmotivs, der *Extended chain*. Die Bindung des monomeren synthetischen Peptids entsprechender Zusammensetzung an die Erkennungssequenz konnte nachgewiesen werden [Jeltsch *et al.*, 1995b], eine Untersuchung eines entsprechenden zweiarmigen Peptids erscheint daher vielversprechend.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden in analysenreiner Form eingesetzt. Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme wurden von verschiedenen Herstellern (zum Beispiel Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Fermentas, Merck, New England Biolabs (NEB), Pharmacia) bezogen und entsprechend den angegebenen Reaktionsbedingungen verwendet.

### 2.2 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1 Nährmedien

Alle Bakterienkulturen werden in Vollmedium nach Luria und Bertani (LB-Medium) angezogen. Es enthält Hefeextrakt (getrocknet, teilweise abgebaute Hefezellen, Gibco-BRL) und Pepton Nr. 140 (Gibco-BRL), deren Zusammensetzungen nicht genau bestimmt sind. Festmedien werden zusätzlich mit 15g Bacto-Agar (Gibco-BRL) pro Liter Medium hergestellt. Es werden nur autoklavierte Lösungen (120°C, 30min) eingesetzt.

Die zur Selektion von Bakterienzellen herangezogenen Antibiotika werden nach Tabelle 2.1 angegebenen Konzentrationen zugesetzt, Flüssigmedien unmittelbar vor Gebrauch, Festmedien nach Abkühlen der Lösungen auf etwa 50°C.

Tab. 2.1: Konzentrationen von Antibiotika in Medien [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Antibiotikum	Flüssigmedium	Festmedium
Ampicillin (Amp)	100	75
Chloramphenicol (Chl)	30	20
Tetracyclin (Tet)	10	10

LB-Medium:	10g	Hefe-Extrakt
	10g	Pepton Nr. 140
	5g	NaCl
		pH7,5 (2M NaOH)

Festmedium	<u>15g</u>	Bacto-Agar
		ad 1l LB-Medium

## 2.2.2 Bakterienstämme

Die verschiedenen *E.coli*-Stämme werden gemäß ihren Eigenschaften eingesetzt. *E.coli* stammen aus der Familie der Enterobacteriaceae, sie sind fakultativ anaerob und gramnegativ.

### GM1674

Genotyp: F' (PO65 von *Hfr*P804), F128-20, *pro*→*lac*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, Δ(*gpt-lac*)5, *supE44*, *galK2*, *galT22*, *λ*<sup>-</sup>, *dcm-6*, *dam-3*, *thi-1*

GM1674 ist methylasedefizient. Ist bei der Mutagenese der Einsatz von Restriktionsendonukleasen nötig, die sensitiv für die Methylierung ihrer Erkennungssequenz durch *dcm*- oder *dam*-Methylierung sind (zum Beispiel *NruI*), so kann die DNA aus diesem Stamm isoliert werden, um sie für dieses Enzym spaltbar zu machen.

### HB101

Genotyp: *thi-1*, *hsdS20*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *supE44*, *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *rpsL20*(*str*<sup>r</sup>), *xyl-5*, *mtl-1*, *mcrBc*, *mrr*, *Γ*<sup>-</sup>, *galK2*

Dieser Stamm ist besonders geeignet für die Herstellung von Plasmid-DNA, die für eine Spaltreaktion herangezogen werden soll, da er nur einen geringen Anteil an offen zirkulärer Plasmidform trägt.

### LK111(λ)

Genotyp: (*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>), *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI*<sup>q</sup>YZ ΔM15, *Hfr*, *λ*<sup>+</sup>

Dieser Stamm ist eine λ-lysogene Variante des Stammes K12. Er exprimiert konstitutiv den λ-Repressor *cl*, so daß Gene, die durch den P<sub>L</sub>-Promotor kontrolliert werden, effektiv reprimiert sind. Dieser Stamm dient hauptsächlich der Vermehrung von Plasmid-DNA.

### TGE900

Genotyp: (*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>), F<sup>-</sup>, *su-1*, *ilv-1*, *bio*[λ*cl857* Δ*Bam* Δ*H1*]

Dieser Stamm exprimiert den thermosensitiven λ-Repressor *cl857*, der bei Temperaturen oberhalb 37°C inaktiviert wird (Monomerbildung). Daher führt eine Erhöhung der Inkubationstemperatur bei Genen, die durch den P<sub>L</sub>-Promotor kontrolliert werden, zu einer nachfolgenden Expression des Genproduktes. Um dies in der Bebrütungsphase zu verhindern, wird der Stamm bei 30°C angezogen.

### WK6mutS( $\lambda$ )

Genotyp: ( $r_K^- m_K^+$ ),  $\Delta[lac\ proAB]$ ,  $galE$ ,  $strA$ ,  $mutS215$ : Tn 10 [ $F'$ ,  $proAB$ ,  $lacI^q$   $\Delta M15$ ],  $\lambda^+$   
Dieser Stamm dient der Replikation von *Mismatch*-Plasmiden, die aus der *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7) hervorgehen. Das verantwortliche Gen für die *Mismatch*-Reparatur,  $mutS$ , wurde durch TN10 zerstört. Somit ist der Stamm nicht in der Lage, fehlgepaarte Basenpaare zu korrigieren. Der Stamm ist  $\lambda$ -lysogen und exprimiert konstitutiv den  $\lambda$ -Repressor, so daß Gene, die vom  $P_L$ -Promotor kontrolliert werden, reprimiert sind.

## 2.2.3 Plasmidvektoren

Plasmide sind als zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle für die Molekularbiologie gut geeignet. Sie replizieren in der Zelle unabhängig vom Genom. Ihre Kopienzahl liegt in Abhängigkeit vom enthaltenen Replikationsursprung zwischen 20 (*Low copy plasmid*) und mehreren hundert (*High copy plasmid*). Sie enthalten neben einem Replikationsursprung (*Origin of replication, Ori*), einen Selektionsmarker (meist eine Antibiotikaresistenz), um die Zelle zu zwingen, das Plasmid zu erhalten. Plasmidvektoren haben typischerweise eine Länge von 2500 bis 10000bp.

### pACYC184

Bei pACYC184 handelt es sich um ein *Low copy*-Plasmid (4244bp) mit dem Replikationsursprung p15A. Es trägt eine Chloramphenicol- und eine Tetracyclinresistenz.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid als Substrat für kinetische Spaltungen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verwendet (siehe 2.6.2.2).

### pBR322

pBR322 dient als Ausgangsvektor für viele Klonierungsvektoren. Es ist 4361bp lang und enthält den Replikationsursprung ColE1. Als Selektionsmarker verfügt es über die Tetracyclin- und die Ampicillinresistenz.

In dieser Arbeit dient das Plasmid als *Template* für die PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes für die Bestimmung von DNA-Bindungskonstanten (siehe 2.5.9) von *EcoRI*-Mutanten.

### pEcoR4

Das Plasmid ist ein Abkömmling des Vektors pACYC184 mit 5929bp. Neben einer Chloramphenicolresistenz trägt es das *ecoRI*-Methylasegen, das konstitutiv exprimiert wird. Dadurch ist die zelleigene DNA vor dem toxischen Genprodukt *EcoRI* geschützt, und eine Überproduktion wird möglich. Es verfügt über den Replikationsursprung p15A und ist somit zu pRIF309+(CH<sub>6</sub>) kompatibel, welches das *ecoRI*-Gen trägt.

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

Der Plasmidvektor pRIF309+(CH<sub>6</sub>) ist ein Abkömmling des Vektors pBR322 mit 5068bp. Es enthält den bakteriellen Replikationsursprung ColE1 zur Replikation des doppelsträngigen Plasmids und den Replikationsursprung des f<sub>1</sub>-Phagen, der nach Superinfektion mit dem Phagen eine Produktion von einzelsträngigem Plasmid ermöglicht. Der Vektor enthält das β-Laktamase-Gen, das durch den Tn903-Tet<sup>R</sup>-Promotor konstitutiv exprimiert wird.

Der Vektor trägt das *ecoRI*-Gen, an dessen C-Terminus sechs Histidine fusioniert sind, die eine Affinitätschromatographische Aufreinigung des Genproduktes (*EcoRI*<sub>His6</sub>) ermöglichen. Das Gen befindet sich unter der Kontrolle des P<sub>L</sub>-Promotors und des f<sub>d</sub>-Terminators. Durch die hohe Toxizität des Genproduktes kann das Plasmid nur in Stämmen gehalten werden, die den λ-Repressor konstitutiv exprimieren.

### pRIStrep

Basierend auf dem Vektor pRIF309+(CH<sub>6</sub>) wurde der C-terminale Hexahistidintag durch einen Affinitätstag nach dem Muster des *StrepTag II* ausgetauscht, der acht Aminosäuren beinhaltet. Die Anzahl der Basenpaare erhöht sich daher auf 5074bp. Das *EcoRI*-Fusionsprotein mit diesem Affinitätstag wird als *EcoRI*<sub>StrepII</sub> bezeichnet.

### pRSN und pRSNX

Basierend auf dem Vektor pRIStrep wurde 21bp hinter dem Stopcodon des *ecoRI*-Gens eine singuläre *NheI*-Schnittstelle eingefügt (pRSN). Das *ecoRI*-Gen in pRIF309+ ist von zwei *XbaI*-Schnittstellen eingerahmt. Die kompatiblen Überhänge von *XbaI* und *NheI* erlauben die selektive Klonierung eines *XbaI*-Fragmentes in den Vektor. Das entstehende Plasmid bei der Klonierung des *ecoRI*-Gens aus pRIF309+(CH<sub>6</sub>) heißt pRSNX (5899bp). Es enthält somit die Gene für die wt-*EcoRI*-Untereinheit mit *StrepTag II* als auch mit Hexahistidintag als polycistronische *Message* (Abstand 27bp) unter der Kontrolle des P<sub>L</sub>-Promotors.

Weitere Plasmide dieser Familie (zum Beispiel mit einer wt-Untereinheit und einer mutierten Untereinheit) werden nach folgendem Muster benannt: pRSNX(wt/D91A). Dabei enthält die zuerst genannte Untereinheit den *StrepTag II*.

### pUC8, pUC18

Plasmide der pUC-Familie werden gewöhnlich als Klonierungsvektor verwendet, der nach Insertion von DNA-Fragmenten in die *Multiple cloning site* des *lacZ*(α)-Fragments und anschließendes *Blue/White-Screening* in geeigneten Stämmen (*lacZ*ΔM15) die Selektion rekombinanter Plasmide erlaubt (α-Komplementation).

In dieser Arbeit werden die Plasmide verwendet, um die Spaltaktivität von *EcoRI*-Proteinen genauer zu charakterisieren (siehe 2.5.10 und 2.5.11). Dabei wird die singuläre *EcoRI*-Schnittstelle in der *Multiple cloning site* verwendet.

## 2.2.4 Transformation von Bakterienzellen

Bakterienzellen nehmen unter normalen Umständen aus dem umgebenden Medium keine DNA auf. Um die Durchlässigkeit der Zellmembran zu erhöhen, müssen die Zellen speziell vorbereitet werden.

Die Transformationseffizienz eines Plasmids ist in hohem Maße von seiner Größe und Form abhängig. Kleine Plasmide (3000-4000bp) erzielen eine höhere Ausbeute bei der Transformation als große (bis 6000bp), ebenso ist die Effizienz mit *supercoiled* Plasmiden höher als bei der offen zirkulären Form oder gar linearer DNA.

### 2.2.4.1 Chemisch kompetente Zellen und Transformation

Chemisch kompetente Zellen werden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt, einem modifizierten Verfahren nach Hanahan (1983). Die Zellen erreichen dabei Kompetenzen von  $10^6$ - $10^8$  Kolonien je  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA. Sie sind bis zu einem Jahr bei  $-70^\circ\text{C}$  stabil.

Kompetente Zellen: Aus einer Übernacht-Kultur wird eine 100ml-LB-Kultur des betreffenden *E.coli*-Stammes angeimpft und die Zellen bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,4-0,6$  angezogen (2-3h). Die Zellen werden sedimentiert (1300g, 10min,  $4^\circ\text{C}$ ), in 100ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte müssen auf Eis mit gekühlten Gefäßen ausgeführt werden.

Nach Sedimentation (wie oben) werden die Zellen in 10ml eiskalter TFB2-Lösung resuspendiert und 15-60min auf Eis aufbewahrt.

Die Zellen werden zu  $100\mu\text{l}$  aliquotiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  schockgefroren.

Transformation:  $100\mu\text{l}$  kompetente *E.coli*-Zellen werden im Eisbad aufgetaut. Die zu überführende Plasmid-DNA (etwa 100ng) wird zu den Zellen gegeben und der Ansatz 45min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen einem Hitzeschock unterzogen (2min), der die Aufnahme von DNA in die Zellen fördern soll. Die Temperatur des Hitzeschocks ist von der Art der Zellen abhängig und liegt  $5-7^\circ\text{C}$  über der optimalen Bebrütungstemperatur.

Nach dem Hitzeschock werden die Zellen auf Eis abgeschreckt, mit  $900\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und 1h bei optimaler Wachstumstemperatur inkubiert.

Die Zellen werden schonend sedimentiert ( $4^\circ\text{C}$ , 1000g, 5min) und anschließend auf festem Selektivmedium ausplattiert.

TFB1-Lösung:           30mM       KAc  
                          100mM      RbCl  
                          10mM       CaCl<sub>2</sub>  
                          59mM       MnCl<sub>2</sub>  
                          15% (w/v) Glyzerin  
                                  ad 410ml  
                                  pH5,8 (0,1M HAc)

Die Lösung wird zu 100ml aliquotiert und autoklaviert.

TFB2-Lösung:           10mM       MOPS  
                          10mM       RbCl  
                          75mM       CaCl<sub>2</sub>  
                          15% (w/v) Glyzerin  
                                  ad 150ml  
                                  pH6,5 (0,1M KOH)

Die Lösung wird zu 10ml aliquotiert und autoklaviert.

#### 2.2.4.2 Elektrokompente Zellen und Elektrotransformation

Die negative Ladung der DNA erlaubt eine Beschleunigung der Moleküle in einem elektrischen Feld. Nach einer Entionisierung der Bakterienzellen ist die Zellmembran soweit vorgeschädigt, daß die Aufnahme von DNA begünstigt wird. In einer Lösung, die keine weiteren Ionen enthält, werden bei der Elektrotransformation die Plasmide durch ein elektrisches Feld (ms-Bereich) in die Zellen katapultiert. Daher sollte die zu überführende DNA-Lösung möglichst salzfrei sein. Die Stärke des elektrischen Impulses ist vom Bakterienstamm abhängig und muß empirisch ermittelt werden. Sie bewegt sich zwischen 1200V und 1600V.

Die erreichten Kompetenzen mit elektrokompente Zellen liegen im allgemeinen höher als für chemisch kompetente Zellen (bis 10<sup>10</sup> Kolonien je µg eingesetzter DNA), doch sind sie nur sehr begrenzt haltbar (zwei Wochen) und sollten möglichst vor jeder Transformation frisch hergestellt werden [Dower *et al*, 1988].

Kompetente Zellen: Aus einer Übernacht-Kultur wird eine 100ml-LB-Kultur des betreffenden *E.coli*-Stammes frisch angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub>=0,5-0,7 wachsen gelassen. Die Zellen werden auf Eis für 15-60min gelagert, dann in einem vorgekühlten Rotor schonend sedimentiert (4000g, 4°C, 10min).

Die Zellen werden mit 100ml steriler 10%iger Glyzerinlösung gewaschen und erneut zentrifugiert (wie oben). In weiteren Waschschrritten wird das Volumen der Glyzerinlösung reduziert (50ml, 12,5ml). Schließlich werden die Zellen in 2-3ml 10%igem Glyzerin aufgenommen, zu 50µl aliquotiert und bei -70°C schockgefroren.

Transformation: 50µl kompetente Zellen des betreffenden *E.coli*-Stammes werden auf Eis aufgetaut, mit 100ng in maximal 5µl Volumen zu überführender DNA vermischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert (1mm Schichtdicke) und in den Elektroporator gestellt (Eppendorf Elektroporator, Typ 2510).

Nach dem elektrischen Puls werden die Zellen mit 900µl LB-Medium aus der Küvette gespült und eine Stunde bei optimaler Wachstumstemperatur inkubiert. Die Zellen werden schonend sedimentiert und auf festem Selektivmedium ausplattiert.

## 2.2.5 Expressionstest und Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß

Der Expressionstest dient der Kontrolle der Funktionalität des mutierten Genproduktes, wobei durch den gleichzeitigen Test der Spaltaktivität aus einem Rohaufschluß bereits schon eine kleine Menge spaltaktiven Proteins detektiert werden kann.

Expressionstest: Aus einer Übernacht-Kultur des Expressionsstamms TGE900(pEcoR4), der die betreffende Mutante enthält, wird eine 3ml LB-Kultur angeimpft. Bei einer  $OD_{600nm}=0,5$  werden 500µl entnommen und kalt gestellt. Nach Zugabe von 500µl 20%iger steriler Glukoselösung wird die Expression in den Zellen durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Nach zwei Stunden werden erneut 500µl entnommen und zusammen mit den Proben vor der Induktion weiter verarbeitet.

Nach Sedimentation (13000g, 5min) werden die Zellen in 30-50µl Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert, für 2min auf 95°C erhitzt und zur elektrophoretischen Trennung auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (Laemmli-Gel, siehe 2.5.2) aufgetragen.

Spaltaktivität aus dem Rohaufschluß: Die Zellen aus 1ml einer induzierten *E.coli*-Kultur (siehe oben) werden sedimentiert (13000g, 5min), in 500µl PDL/500mM NaCl resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier250/Ultrasonics; *Duty Cycle* 50%, *Output Control* 3; vergleiche 2.4.2). Die Zelltrümmer werden erneut sedimentiert (13000g, 15min, 4°C). Der Überstand enthält das exprimierte, lösliche Protein und kann für eine DNA-Spaltung (meist λ-DNA, Reaktionsbedingungen siehe 2.5.10) eingesetzt werden.

Laemmli-Auftragspuffer: (2fach)	50mM	Tris/HCl pH6,8
	100mM	DTT
	2%	SDS
	0,1%	Bromphenolblau
	10% (v/v)	Glyzerin
PDL:	30mM	KP <sub>i</sub> pH7,2
	0,1mM	DTE
	0,01% (v/v)	Lubrol

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wird mit den Produkten der Firma Qiagen gearbeitet. Aus 3ml LB-Kulturen werden mit dem *QIAprep Spin Miniprep* System bis zu 10µg DNA erhalten. Größere Mengen Plasmid-DNA werden mit *QIAGEN-tip 20* (20ml Kulturvolumen) oder *QIAGEN-tip 100* (100ml Kulturvolumen) präpariert (Ausbeute etwa 20µg beziehungsweise 100µg). Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (siehe 2.3.6.1) werden mit *QIAquick Gel Extraction Kit* durchgeführt.

Die jeweiligen Durchführungen erfolgten nach Herstellerangaben.

### 2.3.2 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

In verschiedenen Stufen eines Klonierungsprozesses sind enzymatische Plasmidsplaltungen erforderlich. Die Trennung der Fragmente erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.3.6.1) analytisch oder mit anschließender Wiedergewinnung der DNA für die Klonierung. Die Längenabschätzung von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe eines Standards, wobei die Laufstrecke linearer Fragmente ihrer Länge umgekehrt proportional ist, so daß eine Abschätzung der Größe möglich wird.

Analytische Spaltung: 1-2µg Plasmid-DNA werden mit 10U einer Restriktionsendonuklease gemäß den Herstellerangaben für eine Stunde bei optimaler Temperatur inkubiert.

Präparative Spaltung: 8-10µg Plasmid-DNA werden mit 20U einer Restriktionsendonuklease gemäß den Herstellerangaben für mehrere Stunden oder über Nacht bei optimaler Temperatur inkubiert.

### 2.3.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten ist neben der Restriktionsspaltung eine wichtige Technik in der Molekularbiologie. Die am häufigsten verwendete Ligase ist T4-DNA-Ligase, die aus *E. coli*-Zellen erhalten wird, wenn sie mit dem Phagen T4 infiziert sind. Das Enzym repariert alle Brüche, die in einer doppelsträngigen DNA vorkommen können. Durch die Knüpfung der Phosphodiesterbindungen wird ATP verbraucht, das zu dem Reaktionsansatz zugesetzt werden muß.

Die Ligationsbedingungen sind stark von den zu verknüpfenden Enden der DNA-Fragmente abhängig. Einzelsträngige Überhänge (*Sticky ends*) erleichtern die Ligation, da die DNA-Fragmente schon durch Basenpaarung der Überhänge in Verbindung treten können. Diese Ligationen werden meist bei 37°C ausgeführt. Die Verknüpfung von glatten DNA-Enden (*Blunt ends*) sollte bei niedrigerer Temperatur ausgeführt werden (RT oder 16°C), um die kinetische Energie der Fragmente herabzusetzen.

Im Ansatz werden etwa äquimolare Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Sind die Längen der Fragmente sehr unterschiedlich, kann ein Überschuß des kleineren DNA-Stückes die Ligationsausbeute erhöhen.

Im vom Hersteller empfohlenen Puffer werden äquimolare Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente mit 5mmol ATP versetzt. Die Inkubation erfolgt mit 1-5U T4-DNA-Ligase bei 16-37°C für 30min.

Nach Inaktivierung der Ligase (10min, 65°C, Eis) können mit dem Ligationsprodukten Zellen transformiert werden (siehe 2.2.4).

### 2.3.4 Modifikation von Oligonukleotiden

Synthetischen Oligonukleotiden fehlt die endständige 5'-Phosphatgruppe, die für eine Ligation notwendig ist. T4-Polynukleotidkinase (PNK) ist in der Lage, diese 5'-Phosphatgruppe an jede Art DNA (doppel- oder einzelsträngig) anzufügen.

Die Phosphorylierung von Oligonukleotiden eignet sich auch zur Einführung einer radioaktiven Markierung, indem Nukleotidtriphosphate mit einem Isotop ( $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$ ) in der  $\gamma$ -Position des Nukleotids verwendet werden, das auf das Oligonukleotid übertragen wird. Es ist so allerdings nur eine einzelne Markierung pro Molekül DNA möglich.

Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) hängt ohne Gegenstrang unspezifisch Desoxynukleotide an das 3'-Ende eines Oligonukleotids (doppel- oder einzelsträngig). Um das Entstehen unterschiedlicher Längen zu verhindern, kann in die Reaktion mit Didesoxynukleotiden durchgeführt werden.

5'-Markierung mit PNK: 1,5nmol Oligonukleotid werden mit 10 $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP beziehungsweise [ $\gamma$ - $^{35}$ S]dATP versetzt (Amersham) und im mitgelieferten Reaktionspuffer mit 20u T4-PNK (Fermentas) für 4h bei 37°C inkubiert.

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Erhitzen auf 65°C für 10min.

3'-Markierung mit TdT: 1,5nmol Oligonukleotid werden mit 10 $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP beziehungsweise [ $\alpha$ - $^{35}$ S]ddATP (Amersham) versetzt und im mitgelieferten Reaktionspuffer mit 10u TdT (AGS) für 1h bei 37°C inkubiert.

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Erhitzen auf 65°C für 10min.

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wird das *QIAquick Nucleotide Removal Kit* von Qiagen nach den Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration des Oligonukleotids kann mittels eines UV-Spektrums bestimmt werden.

Nach der Präparation eines Rahmens, der kompatible Überhänge enthält, ist die Religation eine häufige Nebenreaktion, die der erwünschten Klonierung eines DNA-Fragmentes gegenübersteht. Um diese Reaktion zu verhindern, kann eine Dephosphorylierung durchgeführt werden, die die Religation verhindert. Alkalische Phosphatase (CIAP, *Calf intestine alkaline phosphatase*) entfernt Phosphatgruppen am 3'- und 5'-Ende von DNA oder RNA.

Dephosphorylierung: 20pmol DNA-Enden werden im mitgelieferten Reaktionspuffer mit 1U CIAP (Fermentas) versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wird die Lösung für 10min auf 75°C erhitzt, dann auf Eis abgeschreckt.

### 2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Der DNA-Gehalt einer Lösung kann durch Aufnahme eines Spektrums zwischen 220 und 320nm erfaßt werden. Der Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids ( $\epsilon^{260\text{nm}}$ ) ergibt sich dabei aus der Summe der Koeffizienten der einzelnen Nukleotide:

$\epsilon^{260\text{nm}}$ [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	A	15158
	G	11616
	T	8500
	C	7345

Für die Berechnungen anderer DNA-Gehalte werden die folgenden, allgemein verwendeten spektroskopischen Umrechnungen [Sambrook *et al.*, 1989] eingesetzt:

1OD <sub>260nm</sub> dsDNA	50µg/ml
1OD <sub>260nm</sub> ssDNA	30µg/ml

## 2.3.6 Elektrophoretische Trennung von DNA

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, Moleküle mit unterschiedlicher Ladungsdichte in einem elektrischen Feld zu trennen. Bei DNA ist die Wanderungsgeschwindigkeit der linearen Fragmente annähernd dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes proportional.

Je nach Größe der DNA werden für die Elektrophorese von DNA unterschiedliche Trägermaterialien in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Polyacrylamid eignet sich für DNA-Fragmente kleiner als 500bp, Agarose wird für DNA-Fragmente größer als 300bp verwendet.

Der Nachweis der DNA-Banden geschieht durch Anfärben mit Ethidiumbromid. Es interkaliert als aromatisches Molekül zwischen Basenpaaren, so daß die Doppelhelix teilweise entwunden wird. Durch die aromatische Umgebung in der DNA erhöht sich das Fluoreszenzverhalten von Ethidiumbromid um ein Vielfaches, so daß die Banden durch Anregung mit ultraviolettem Licht (312nm) zu erkennen sind (UV-Transilluminator, Chema 4). Die Dokumentation erfolgt mit E.A.S.Y RH-3 (*Enhanced analysis system*, Herolab), die Bilder werden über einen Drucker (Mitsubischi *Video copy processor*) erhalten.

Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 25ng DNA.

### 2.3.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Agarose ist ein aus Seetang gewonnenes lineares Polysaccharid, das in unterschiedlichem Ausmaß mit Methoxy-, Pyruvat- und Carboxy-Gruppen substituiert sein kann. Es bildet ein Netzwerk, das die Wanderung der zu trennenden DNA-Fragmente herabsetzt.

Die Konzentration der Gele variiert von 0,6%ig für DNA-Fragmente größer 25000bp bis 2%ig für Fragmente kleiner 500bp.

Für ein 1%iges Gel wird 1g Agarose in 100ml Laufpuffer (TPE-Puffer) aufgekocht (Mikrowelle), bis die Agarose vollständig gelöst ist. Sie wird in eine vorbereitete horizontale Elektrophoresekassette (20x10x0,5cm) gegossen, in der sie erstarrt. Vor der Verwendung wird das Gel mit Laufpuffer überschichtet.

Die DNA-Proben werden mit Agaroseauftragspuffer versetzt und in die

Taschen überführt. Die Elektrophorese erfolgt bei 60V und 100mA für etwa zwei Stunden. Dabei sollte das Gel gekühlt und der Puffer umgepumpt werden.

Zur Dokumentation der DNA-Banden werden 10µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) in 100ml warmem Wasser verteilt (Endkonzentration etwa 0,5µg/ml) und das Gel für 10min gefärbt. Zum Entfärben der Agarose wird das Gel für weitere 10min in warmes Wasser gelegt.

Die Dokumentation erfolgt wie oben beschrieben.

TPE-Puffer:	900mM	Tris
(10fach)	20mM	EDTA
		pH8,2 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )

Agaroseauftragspuffer:	0,25M	EDTA
(5fach)	1,2%	SDS
	25%	Saccharose
	0,1%	Bromphenolblau
	0,1%	Xylen Cyanol FF

### 2.3.6.2 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese erlaubt die Trennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in einem Bereich von 5-1000bp zum Beispiel aus Restriktionsspaltungen (siehe 2.3.2) oder PCR-Produkten (siehe 2.3.11). Je nach Vernetzungsgrad (5-10%) können unterschiedliche Fragmente aufgetrennt werden. Als Gel- und Laufpuffer wird TTE verwendet. Als Stammlösung dient eine 30%ige Lösung Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1) der Firma AGS.

Die Gellösung (gewünschte Polyacrylamidkonzentration in TTE) wird zwischen zwei vorbereitete Glasplatten (95x65x1mm) gegossen und nach der Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt.

Die Proben werden vor dem Auftrag auf das Gel mit PAA-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wird bei konstant 30mA durchgeführt.

Die Anfärbung des Gels erfolgt auf der Glasplatte in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5µg/ml) für 10min.

Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgt wie oben beschrieben.

TTE:	1,8M	Tris (nicht eingestellt)
(20fach)	575mM	Taurin
	2,7mM	EDTA

PAA-Auftragspuffer: (5fach, nativ)	10mM	Tris/HCl pH8,0
	1mM	EDTA
	50% (v/v)	Glyzerin
	0,2% (w/v)	Azorubin
	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
	0,2% (w/v)	Xylen Cyanol FF

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

Denaturierende Polyacrylamidgele dienen zur Kontrolle der Länge von synthetischen Oligonukleotiden Größe und Reinheit. Als Gel- und Laufpuffer wird TTE verwendet. Durch den in der Gellösung enthaltenen Harnstoff (8,3M), die Erhitzung des Gels während des Laufes und Formamid im Auftragspuffer stellen sich denaturierende Bedingungen ein, so daß die DNA im einzelsträngigen Zustand vorliegt.

Die Gellösung wird zwischen zwei vorbereitete Glasplatten (95x65x1mm) gegossen und nach der Polymerisation in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt.

Vor dem Probenauftrag sollte das Gel einem Vorlauf bei konstant 30mA unterzogen (30min) werden. Die Proben werden mit *Shadow casting*-Auftragspuffer versetzt und denaturiert (5min, 95°C) und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophorese findet bei konstant 30mA statt.

Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgt auf einer folienumhüllten Kieselgel-DC-Platte mit Fluoreszenzindikator (KG 60 F254, Merck). Die Banden werden unter UV-Licht (Universal UV-Lampe, Camag) bei 254nm sichtbar gemacht. Die Absorption der DNA-Banden von Licht dieser Wellenlänge bewirkt einen Schattenwurf (*shadow casting*), der auf der DC-Platte zu sehen ist.

<i>Shadow casting</i> -Gellösung:	6ml	Sequenzierfertiglösung (19:1, AGS)
	2g	Harnstoff
	250µl	20fach TTE

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

### 2.3.7 Gapped duplex-Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese ist nach der *Gapped duplex*-Methode möglich [Kramer *et al.*, 1984; Vennekohl, 1996] (siehe Abbildung 2.1).

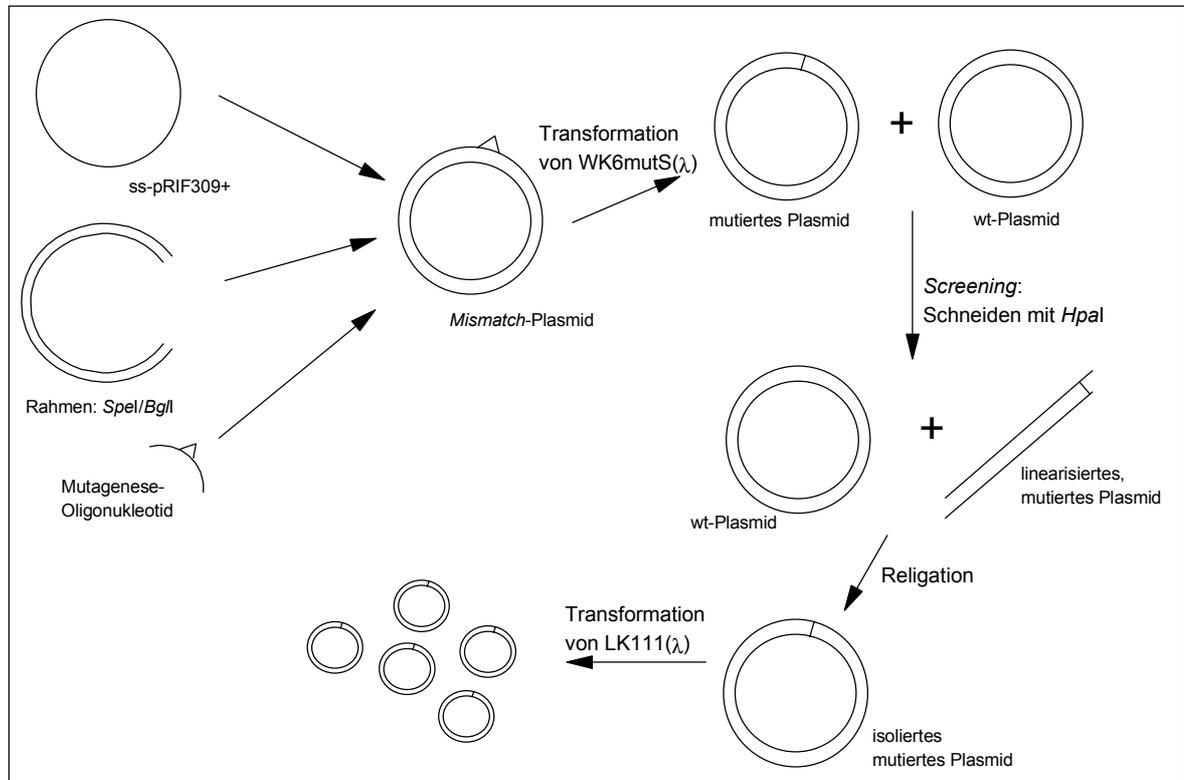


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der *Gapped duplex*-Mutagenese am Beispiel von K226C

Zur Einführung der Mutation wird ein Oligonukleotid (*Primer*) synthetisiert, das außer der Aminosäuremutation eine stille Mutation enthält, die zwar die Basensequenz zur Erzeugung oder Zerstörung einer Restriktionsspaltstelle enthält, aber die Aminosäuresequenz nicht verändert. So ist eine Anreicherung mutierter Klone möglich. Das Mutageneseoligonukleotid sollte eine Länge von mindestens 30 Basen aufweisen, um trotz der Basenfehlpaarungen durch die Mutation eine exakte Hybridisierung zu gewährleisten.

Aus einer mit  $f_1$ -Phagen superinfizierten Bakterienkultur, die das zu mutierende Plasmid mit  $f_1$ -Replikon (hier  $pRIF309+(CH_6)$ ) enthält, wird einzelsträngige Plasmid-DNA aufgereinigt [Vennekohl, 1996]. Auf dieser Matrize erfolgt die Hybridisierung des Mutageneseoligonukleotids und eines Rahmens, der aus dem gleichen Plasmid durch Restriktionsspaltung (siehe 2.3.2) hergestellt wird und den zu mutierenden Bereich frei hält (*Gap*) (siehe Abbildung 2.1). Einzelsträngige Bereiche werden durch T7-DNA-Polymerase komplettiert und mit T4-DNA-Ligase kovalent geschlossen. Mit dem entstehenden *Mismatch*-Plasmid wird der reparaturdefiziente *E.coli*-Stamm WK6mutS( $\lambda$ ) (siehe 2.2.2) transformiert (siehe 2.2.4).

Eine Anreicherung positiver Klone ist über die stille Mutation möglich. Bei Einfüh-

zung einer Restriktionsspaltstelle wird die isolierte DNA mit dem entsprechenden Enzym gespalten (siehe 2.3.2), religiert (siehe 2.3.3) und anschließend in LK111( $\lambda$ ) überführt (siehe 2.2.4). Bei Zerstörung einer Restriktionsspaltstelle kann der Ansatz direkt nach dem Verdau in Zellen überführt werden. Die theoretische Ausbeute der Mutagenese beträgt 50%.

Mit Hilfe der *Gapped duplex*-Mutagenese werden Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* hergestellt. Tabelle 2.2 stellt die Ausgangssequenz den *Primer*sequenzen gegenüber und führt die eingeführten Restriktionsschnittstellen auf.

Außerdem erfolgt durch diese Methode die Einführung einer singulären Restriktionsschnittstelle (*NheI*) in das Plasmid pRISrep für die Klonierung einer polycistronischen *Message* (siehe 2.3.9).

Tab. 2.2: Sequenzen der Mutageneseprimer der *EcoRI*-Mutanten

Mutante	Sequenz
wt	ACA GAA GCT TTA AAA AAA ATT <b>GAC</b> CCT GAT CTT GGC GGT ACT TTA TTA Asp74
D74C	GAA GCT TTA AAA AAA ATT <b>TGT</b> <u>CCA</u> <u>GAT</u> CTT <u>GGC</u> GGT ACT TTA TT Cys PflMI
D74K	GAA GCT TTA AAA AAA ATT <b>AAG</b> CCT <u>GAC</u> <u>CTA</u> <u>GGC</u> GGT ACT TTA TT Lys AvrII
wt	AAT ATA TCA GAG ATA GCG AAT TTT ATG <b>CTC</b> TCT GAG AGC CAC Leu158
L158C	T ATA TCA GAG <u>ATC</u> <u>GCG</u> <u>AAT</u> TTT ATG <b>TGC</b> TCT GAG AGC C NruI Cys
wt	CTA TGT ATT AAC <b>AAA</b> TTT GTA AAT CAT <b>AAA</b> GAC AAA AGC ATT ATG CTA Lys221 Lys226
K221C	CTA TGT ATT AAC <b>TGT</b> TTT <u>GTT</u> <u>AAC</u> CAT AAA GAC AAA AGC ATT AT Cys HpaI
K221D	CTA TGT ATT AAC <b>GAC</b> <u>TTT</u> <u>GTC</u> AAT CAT AAA GAC AAA AGC ATT AT Asp Thr111I
K226C	GT ATT AAC AAA TTT <u>GTT</u> <u>AAC</u> CAT <b>TGT</b> GAC AAA AGC ATT ATG C HpaI Cys
K226D	GT ATT AAC AAA TTT <u>GTT</u> <u>AAC</u> CAT <b>GAT</b> GAC AAA AGC ATT ATG C HpaI Asp
wt	AAT CAT AAA GAC AAA AGC <b>ATT</b> ATG CTA CAA GCA GCA TCT Ile230
I230C	AAT CAT AAA GAC AAA AGC <b>TGC</b> <u>ATG</u> CTA CAA GCA GCA TC Cys PaeI
wt	ACT TCG CTC AGA GTG TTG GGG CGT <b>GAC</b> TTG TTT GAA CAG CTT ACT Asp269
D269C	CT TCG CTC AGA GTG <u>CTC</u> <u>GGG</u> CGT <b>TGC</b> TTG TTT GAA CAG CTT ACT AvaI Cys
D269K	CT TCG CTC AGA GTG <u>CTC</u> <u>GGG</u> CGT <b>AAA</b> TTG TTT GAA CAG CTT ACT AvaI Lys

Im Vergleich zum wt veränderte Basen sind kursiv dargestellt (Unterstreichung: eingeführte Schnittstelle).

### 2.3.8 Konstruktion des Fusionsproteins *EcoRI*<sub>StrepII</sub>

Infolge der Komplikationen, die sich bei einigen Messungen mit der Aggregation von *EcoRI*-Mutanten mit Hexahistidintag ergeben, wird ein anderer Affinitätstag an das Enzym fusioniert. Es werden sechs gleiche Aminosäuren (His<sub>6</sub>) mit starkem Aggregationspotential durch acht unterschiedliche Aminosäuren im *StrepTag II* ersetzt (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), so daß eine Affinität zwischen Tag unterschiedlicher Proteine unwahrscheinlicher wird.

Mit dem Hexahistidintag wurde in das *ecoRI*-Gen eine *SpeI*-Schnittstelle (A↓CTAGT) eingefügt, die direkt vor dem Tag lokalisiert ist [Rotzal, 1992]. Neun Basenpaare hinter dem Stopcodon befindet sich eine *PacI*-Schnittstelle (TTAAT↓TAA). In einer Rahmenpräparation wird das Ausgangsplasmid pRIF309+(CH<sub>6</sub>) mit beiden Enzymen präparativ geschnitten (siehe 2.3.2). Die Überhänge der Restriktionschnittstellen sind nicht kompatibel, so daß der Rahmen ohne Dephosphorylierung verwendet werden kann.

Die Einführung des *StrepTag II* erfolgt durch ein synthetisches doppelsträngiges Oligonukleotid, das die zum Rahmen kompatiblen Überhänge trägt (siehe Tabelle 2.3).

Tab. 2.3: Sequenzen der Oligonukleotide zur Generierung des *StrepTag II*

Name	Sequenz
StrepTag Hin	5' CTAGTAAGTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAAATGATCATTTAAT
StrepTag Rück	3' ATTCAGCTCGGTGGGCGTCAAGCTTTTTACTAGTAAAT

Die beiden Oligonukleotide werden zum *Annealing* in äquimolaren Mengen gemischt, auf 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Phosphorylierung (siehe 2.3.4) der nun doppelsträngigen Oligonukleotide werden sie äquimolar und im Überschuß (1:50) zum Rahmen in die Ligation (siehe 2.3.3) eingesetzt. Der Ligationsansatz wird 30min bei 37°C und 30min bei RT inkubiert. Nach Inaktivierung der Ligase (10min, 65°C, Eis), werden mit dem Ansatz LK111(λ) (siehe 2.2.4) transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

Mit der Sequenz des *StrepTag II* wird eine zusätzliche *AsuI*-Schnittstelle in das Plasmid eingefügt, das entstehende Fragment eines *AsuI*-Verdaus hat eine Länge von 100bp. Eine Trennung der *Screening*produkte wird auf einem 10%igen Polyacrylamidgel erreicht (siehe 2.3.6).

Der positiv mutierte Vektor trägt den Namen pRIS<sub>Strep</sub>.

### 2.3.9 Klonierung einer polycistronischen *Message* aus zwei *ecoRI*-Genen

Polycistronische *Messages* sind in *E.coli* häufig vertreten. Dabei werden zwei oder mehr Gene durch einen Promotor kontrolliert und daraus ein einziges mRNA-Molekül abgelesen. Die Abstände dieser Gene sind sehr variabel, wobei überwiegend eine überlappende Anordnung der Gene (bis zu 7bp) vorkommt.

Im Ausgangsvektor pRIF309+(CH<sub>6</sub>) ist das *ecoRI*-Gen von *XbaI*-Restriktionsstellen flankiert. Sie liegen 7bp vor dem Startcodon, und damit noch vor der Shine Dalgarno-Sequenz, und 53bp hinter dem Stopcodon. So enthält ein Fragment aus einer *XbaI*-Spaltung (921bp) alle Informationen, um hinter einem Promotor zu funktionieren.

Mithilfe der *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.5.10) wird in den Vektor pRISrep, der das *ecoRI*<sub>StreptII</sub>-Gen trägt, eine *NheI*-Site eingefügt (21bp nach dem Stopcodon, Sequenz siehe Tabelle 2.4). Das mutierte Plasmid heißt pRSN. Die Überhänge von *NheI* und *XbaI* sind kompatibel, so daß ein *XbaI*-Fragment, das aus einem pRIF309+(CH<sub>6</sub>) gewonnen wird, in einem mit *NheI* linearisierten Vektor klonierbar ist. Die entstehende Sequenz ist weder durch *NheI* noch durch *XbaI* spaltbar.

Tab. 2.4: Sequenz des Mutageneseoligonukleotids zur Generierung der *NheI*-Site

Name	Sequenz
pRISrepNhe	TTAATGGCTAGCAATGCAACAAAC

Aus der Ligation (siehe 2.3.3) des mit *NheI* linearisierten Vektors pRSN mit einem *XbaI*-Fragment aus pRIF309+(CH<sub>6</sub>) entsteht das Plasmid pRSNX (5988bp), das wt-*EcoRI*<sub>StreptII</sub>- und wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>-Untereinheiten zu gleichen Teilen exprimiert. Die Hälfte des gebildeten Genproduktes sollte daher die gewünschte Kombination von Untereinheiten aufweisen.

### 2.3.10 DNA-Sequenzierung

Eingebrachte Mutationen werden durch eine Sequenzierung der veränderten DNA verifiziert. Um Sekundärmutationen auszuschließen, wird das gesamte *ecoRI*-Gen im Anschluß an eine Mutagenese sequenziert. Verwendet wird die Didesoxy-Methode [Sanger *et al.*, 1977], die mit T7-DNA-Polymerase (Pharmacia) arbeitet.

Auf die betreffende DNA wird ein synthetisches Oligonukleotid (*Primer*, Sequenzen siehe Tabelle 2.5) hybridisiert, das von der Polymerase verlängert wird. Die Reaktion wird in vier parallelen Ansätzen ausgeführt. Neben den Desoxynukleotidtriphosphaten, von denen eines radioaktiv markiert ist, enthält die Reaktionslösung je eine Base als Didesoxynukleotidtriphosphat. Der Einbau eines solchen Didesoxynukleotids führt zu einem Kettenabbruch, da die Polymerase die 3'-OH-Gruppe benötigt, um die fol-

gende Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Die mittlere Kettenlänge der Syntheseprodukte hängt vom Verhältnis der Didesoxynukleotide zu den Desoxynukleotiden ab.

In einem denaturierenden Polyacryamidgel werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Die Basensequenz kann dann von einem Autoradiogramm abgelesen werden.

Die Durchführung der Sequenzierreaktion und des Sequenziergels ist bei Vennekohl (1996) beschrieben.

Tab. 2.5: *Primersequenzen für die Sequenzierung des ecoRI-Gens nach Sanger*

Name	Sequenz
H239	TTCAAAGCAGAAGGC
H1	GATCTTGCGGTA
M2	TCGAAAGATCTCATAA
H955	TGTATTAACAAATTT

### 2.3.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten, deren Endsequenzen bekannt sind und daher eine Synthese entsprechender Oligonukleotide ermöglichen, die der Polymerase als *Primer* dienen. Sie sollten eine vergleichbare Schmelztemperatur aufweisen und müssen komplementär zu je einem Strang der DNA sein, so daß bei der Hybridisierung beide Einzelstränge amplifiziert werden.

Als Enzym dient zumeist die hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* [Mullis & Faloona, 1987]. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72°C, doch toleriert das Enzym kurzzeitig Temperaturen bis 95°C. Zur Herstellung von PCR-Produkten, die für eine Mutagenese eingesetzt werden, empfiehlt sich die Verwendung einer *Proofreading*-Polymerase wie *Pfu*-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*), das die geringste Fehlerate aufweist [Flaman *et al.*, 1994].

Die PCR-Reaktion beginnt mit der Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95°C. Beim Abkühlen des Ansatzes hybridisieren die *Primer* auf die nun einzelsträngige DNA. Die thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert die neuen Stränge bei einer Arbeitstemperatur von 72°C, so daß zwei Moleküle doppelsträngige DNA entstehen (Extension). Die neuen Doppelstränge werden wieder denaturiert, so daß erneut Einzelstränge entstehen. Sie hybridisieren nach dem Abkühlen mit den *Primern*, die dann wieder von der Polymerase verlängert werden.

Bei der Wiederholung von DNA-Denaturierung, Hybridisierung der *Primer* und Extension durch die Polymerase findet in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA statt.

Es ergibt sich somit, abhängig von der Anzahl der Zyklen, eine exponentielle Anreicherung um den Faktor  $10^6$ - $10^7$ .

Die Bedingungen der einzelnen PCR-Reaktionen sind an entsprechender Stelle aufgeführt. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt nach dem *QIAquick PCR Purification*-Protokoll.

## 2.4 Proteinisolierung

### 2.4.1 Fermentation

Die Fermentation dient der Gewinnung von rekombinatem Protein in größerem Maßstab. Aus einem 8l-Fermenter werden dabei 30-40g feuchtes Pellet *E.coli*-Zellen erhalten. Das Wachstum der Zellen ist stark von der Toxizität des Genproduktes abhängig.

Nach dem Zusammenbau wird der Fermenter mit 6l entionisiertem Wasser befüllt und über Nacht bei 120°C sterilisiert. Nach Anschluß von Luftzufuhr und Thermostat an dem abgekühlten Fermenter wird 1l autoklaviertes LB-Medium (10fach) zugesetzt. Der pH-Wert wird mit 2M NaOH auf 7,5 eingestellt. Die Abluft des Fermenters wird durch zwei Waschflaschen mit einer desinfizierenden Lösung (4% Kohrsolin, Bode Chemie) geleitet. Als Entschäumer dienen 1-2ml Extran A-31 (Merck).

Nach Zugabe von Antibiotika (1g Ampicillin und 0,3g Chloramphenicol bei der Fermentation des Genproduktes *EcoRI* aus TGE900(pEcoR4) wird der Fermenter mit 500ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Expressionsstammes angeimpft und bei 30°C bis zu einer  $OD_{600nm}=1,5-2$  bebrütet. Der pH-Wert muß regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden.

Nach Zugabe von 500ml Glukoselösung (200g/l) und 500ml Casein-Lösung (200g/l) wird die Expression durch Temperaturerhöhung auf 42°C eingeleitet. Nach einer Induktionsdauer von 1,5-2h werden die Zellen sedimentiert (5000rpm, 10min, RT) und in 200ml ST-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 50ml PDL/500ml NaCl aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

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

PDL:	30mM	KP <sub>i</sub> pH7,2
	0,1mM	DTE
	0,01% (v/v)	Lubrol

## 2.4.2 Ultraschallzellaufschluß

Es gibt eine Vielzahl von chemischen und mechanischen Methoden zum Zellaufschluß. In dieser Arbeit wurde Ultraschall verwendet.

Die gerade aufgetauten Zellen eines Fermenters (50ml) werden in ein Becherglas überführt und zehnmal für jeweils 30s beschallt (Branson Sonifier250/Ultrasonics; *Duty Cycle* 50%, *Output Control* 5; 30s Pause). Die Zellen werden dabei auf Eis gehalten und nach jeder zweiten Beschallung durchmischt, um ein Aufheizen zu verhindern. Zur Abtrennung der Zelltrümmer und nicht aufgeschlossener Zellen wird der Aufschluß zentrifugiert (10K, 70min, 4°C). Man erhält so das klare Zellysat, aus dem das überexprimierte Protein durch geeignete Verfahren isoliert werden kann (siehe 2.4.3).

## 2.4.3 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird die Bindung eines Liganden an eine spezielle Matrix ausgenutzt. Ist dieser Ligand an das Zielprotein fusioniert, so ist eine Aufreinigung über die Affinitätsmatrix möglich. Viele Klonierungsstrategien sehen wahlweise ein N- oder C-terminales Fusionsprotein vor. Eine Abspaltung des *Affinitätstags* nach der Aufreinigung ist wünschenswert, um ein natives Protein zu erhalten.

In dieser Arbeit werden der *Hexahistidintag* und der *StrepTag II* verwendet.

### 2.4.3.1 Affinitätschromatographie mit dem Hexahistidintag

Eine Aufreinigung der Mutanten, die mit einem C-terminalen Hexahistidintag exprimiert wurden, erfolgt über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen). Die funktionelle Gruppe der Matrix sind Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die durch Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert sind [Hochuli, 1990]. Unter geeigneten Pufferbedingungen können die Histidine zwei der insgesamt sechs Koordinationsstellen besetzen, so daß eine Aufreinigung des Fusionsproteins möglich ist. Um eine Bindung von DNA an das Zielprotein oder die Matrix zu vermeiden, wird unter Hochsalz-Bedingungen (0,5-1M NaCl) gearbeitet.

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Imidazol, das um die Bindungsplätze kompetiert.

1-2ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose werden in eine Säule überführt und mit zehn Säulenvolumina PDL/500mM NaCl/10mM Imidazol äquibriert.

Das klare Zellysat (siehe 2.4.2) wird 1:4 mit PDL/500mM NaCl verdünnt, um die Viskosität der Lösung herabzusetzen. Der pH-Wert der Lösung und die Leitfähigkeit müssen vor dem Auftrag auf die Säule mit dem Äquibrierungspuffer angeglichen werden. Anschließend wird mit dem 10fachen Säulenvolumen Äquibrierungspuffer gewaschen.

Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von jeweils 100ml 10-150mM Imidazol in PDL/500mM NaCl. Das Eluat wird in Fraktionen zu etwa 5ml aufgefangen, die zusammen mit den Waschfraktionen und dem Säulenmaterial auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) auf ihren Proteingehalt überprüft werden.

Die Eluate mit dem zu isolierenden Protein werden vereinigt in eine Ionenaustauschchromatographie (siehe 2.4.4) eingesetzt.

Kleinere Zellmengen (aus 0,1-1l Kulturen) werden mit einem entsprechend geringeren Volumen Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (250-500µl) aufgereinigt. Um ein genügend großes Gelbett zu erhalten, kann die Agarose mit Sephadex G-25 (Pharmacia, Ausschlußgrenze 5000Da) verdünnt werden. Wasch- und Elutionsschritte erfolgen analog zum oben beschriebenen Verfahren mit entsprechend reduzierten Volumina.

Statt eines Elutionsgradienten ist auch ein *Batch*verfahren möglich. Nach dem Waschschrift mit zehn Säulenvolumina PDL/500mM NaCl/10mM Imidazol, wird ein zusätzlicher Waschschrift mit fünf Säulenvolumina in PDL/500mM NaCl/50mM Imidazol durchgeführt. Die Elution erfolgt dann mit einem Säulenvolumen PDL/500mM NaCl/150mM Imidazol.

PDL:	30mM	KP <sub>i</sub> pH7,2
	0,1mM	DTE
	0,01% (v/v)	Lubrol

### 2.4.3.2 Affinitätschromatographie mit dem *StrepTag II*-System

Das *StrepTag II*-System erlaubt eine effektive Aufreinigung von Fusionsproteinen mit dem *StrepTag II*-Peptid [Schmidt *et al.*, 1996] über eine Affinitätsmatrix mit immobilisiertem *StrepTactin*. Beide Komponenten wurden speziell für eine Proteinaufreinigung entwickelt. Die Dissoziationskonstante des *StrepTag II*-Peptids von *StrepTactin* beträgt 1µM [Voss & Skerra, 1997]. Der Affinitätstag kann C- oder N-terminal oder zwischen zwei Domänen kloniert werden.

Die Chromatographie erlaubt physiologische Bedingungen, doch ist eine Bindung an die Matrix auch unter Hochsalz-Bedingungen (bis 1M NaCl) oder unter Zusatz milder Detergenzien möglich. Die Kompetition mit Desthiobiotin erlaubt eine schonende Elution des gereinigten rekombinanten Proteins von der Affinitätsmatrix.

0,5-1ml *StrepTactin* werden in eine Säule überführt und mit zehn Säulenvolumina PDL/500mM NaCl äquilibriert.

Das klare Zellysat (siehe 2.4.2) wird 1:4 mit PDL/500mM NaCl verdünnt, um die Viskosität der Lösung herabzusetzen. Anschließend wird mit dem zehnfachen Säulenvolumen Äquilibrationpuffer gewaschen. In einem zweiten Schritt wird mit fünf Säulenvolumina PDL/500mM NaCl/0,1mM Desthiobiotin gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem Säulenvolumen PDL/500mM NaCl/5mM Desthiobiotin.

Die Waschfraktionen, das Eluat und das Säulenmaterial werden auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) auf ihren Proteingehalt überprüft. Sollte das Säulenmaterial noch Protein gebunden haben, wird erneut mit gleicher Menge Elutionspuffer nachgewaschen.

Das Eluat weist meist eine so hohe Reinheit auf, daß es gleich gegen den Aufbewahrungspuffer dialysiert werden kann (siehe 2.4.5).

PDL:	30mM	KP <sub>i</sub> pH7,2
	0,1mM	DTE
	0,01% (v/v)	Lubrol

## 2.4.4 Ionenaustauschchromatographie

Durch den Einsatz von Ionenaustauschmaterialien ist eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung der angereinigten Proteine möglich. Es wird dafür Phosphozellulose (P-Zell, Whatman) verwendet. Da es sich in dieser Arbeit um DNA-bindende Enzyme handelt, gehen sie eine wesentlich stärkere Bindung mit der Phosphozellulose ein als andere Proteine. DNA wird aufgrund ihrer negativen Ladung nicht gebunden, so daß eine quantitative Abtrennung erreicht werden kann.

5ml Phosphozellulose werden in eine Säule überführt und mit zehn Säulenvolumina PEDL/100mM NaCl äquilibriert.

Die *EcoRI*-haltigen Lösungen der Affinitätschromatographie werden mit PEDL auf die Leitfähigkeit des Äquilibrationpuffers (etwa 1:5) verdünnt. Die Säule wird dann mit dem zehnfachen Säulenvolumen PEDL/100mM NaCl gewaschen.

Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von jeweils 100ml

PEDL/100mM NaCl bis PDL/1,5M NaCl. Das Eluat wird in Fraktionen aufgefangen, die zusammen mit den Waschfraktionen und dem Säulenmaterial auf einem Laemmigel (siehe 2.5.2) auf den Proteingehalt überprüft werden.

Die Eluate mit der gewünschten Proteinbande werden vereinigt und zur Stabilisierung in die Dialyse (siehe 2.4.5) eingesetzt.

Analog zur Affinitätschromatographie kann auch hier die Elution im *Batch*verfahren erfolgen. Nach dem Waschen mit PEDL/100mM NaCl wird die NaCl-Konzentration des Puffers schrittweise auf 330mM, 660mM, 1M, 1,33M, 1,66M und 2M erhöht.

PEDL:	30mM	KP <sub>i</sub> pH7,2
	1mM	EDTA
	0,1mM	DTE
	0,01% (v/v)	Lubrol

## 2.4.5 Dialyse von Proteinlösungen

Zur dauerhaften Lagerung von Proteinen werden die wässrigen Lösungen gegen 1l glyzerinhaltigen Puffer über Nacht dialysiert. Sie sind dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerbar.

Dialysepuffer:	300mM	NaCl
	70% (v/v)	Glyzerin in PDL

## 2.5 Proteincharakterisierung

### 2.5.1 Konzentrationsbestimmung

Proteinspektren werden von 220-320nm in einer Quarzküvette (durchlässig für UV-Licht bis 180nm) gegen Luft als Referenz gemessen (U3210 Spectrophotometer, Hitachi).

Der Extinktionskoeffizient von *EcoRI* beträgt  $\epsilon^{278\text{nm}}=8,3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und wird für die Proteinvarianten als identisch angenommen.

## 2.5.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli

Zur Identifizierung eines Proteins in einem Gemisch (zum Beispiel in einem Zellaufschluß) oder um die Reinheit einer Präparation zu überprüfen, wird eine denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Zusatz von Natriumdodecylsulfat SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol) in einem diskontinuierlichen Puffersystem verwendet [Laemmli, 1970].

Um die Identifizierung des Genproduktes *EcoRI* aus einem komplexen Gemisch von Proteinen eines Zellaufschlusses zu erreichen, werden 17,5%ige Gele zur Trennung eingesetzt. Für die Trennung von Proteingemischen größeren Molekulargewichts können auch Gele mit 12,5% eingesetzt werden. Um die Auflösung der Proteinbanden zu erhöhen, durchlaufen die Proben zunächst ein Sammelgel (6%), das durch vom Trenngel abweichenden pH-Wert (Änderung der Ladung der Glyzine im Puffer) zu einer Erhöhung der Bandenschärfe beiträgt.

Das Trenngel wird zwischen vorbereitete Glasplatten (95x65x1mm) bis etwa 2cm unter den Rand gegossen und sofort vorsichtig mit Ethanol überschichtet, um einen waagerechten Abschluß des Gels zu erhalten. Nach der Polymerisation wird der Alkohol abgegossen, die Geloberfläche an der Luft getrocknet und anschließend das Sammelgel gegossen und ein Probentaschenkamm eingeführt. Das Gel wird anschließend in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die Elektrophorese erfolgt bei konstant 30mA, bis das Bromphenolblau den unteren Puffertank erreicht hat.

Probenvolumina mit ausreichender Proteinkonzentration können unkonzentriert mit 5 $\mu$ l Laemmli-Auftragspuffer versetzt und direkt verwendet werden (maximales Gesamtvolumen 25 $\mu$ l).

Größere Probenvolumina werden zur Konzentrierung mit gleichem Volumen 20%iger TCA (w/v) versetzt und gut gemischt. Die Sedimentation des Niederschlags erfolgt durch Zentrifugation (13000rpm, 30min, 4°C). Der Überstand wird entfernt, und das Präzipitat in 20 $\mu$ l Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert. Zur Neutralisation werden die Proben mit 1-2 $\mu$ l 2M Tris-Lösung versetzt.

Zellysate werden wie unter 2.4.2 beschrieben erhalten.

Vor dem Auftrag auf das Gel werden die Proben für 2min auf 95°C erhitzt, und anschließend im Eisbad abgeschreckt.

Der Proteinnachweis erfolgt durch Anfärben der Banden in Laemmli-Färbelösung (Nachweisgrenze etwa 10ng). Nach einmaligem Aufkochen wird das Gel in 7%iger Essigsäure (w/v) durch erneutes Kochen entfärbt, während die Färbung der Proteinbanden erhalten bleibt.

Elektrodenpuffer: (10fach)	0,25M 1% (w/v) 1,9M	Tris/HCl pH8,3 SDS Glycin
Trenngel 17,5%:	58ml 28ml 10ml 4ml	30% AA (w/v), 0,8% BisAA (w/v) 1,5M Tris/HCl pH8,8 1% (w/v) SDS ddH <sub>2</sub> O
Trenngel 12,5%:	42ml 28ml 10ml 20ml	30% AA (w/v), 0,8% BisAA (w/v) 1,5M Tris/HCl pH8,8 1% (w/v) SDS ddH <sub>2</sub> O
Sammelgel 6%:	20ml 12,5ml 10ml 47,5ml	30% AA (w/v), 0,8% BisAA (w/v) 1M Tris/HCl pH6,8 1% (w/v) SDS ddH <sub>2</sub> O
Laemmli-Auftragspuffer: (2fach)	50mM 100mM 2% (w/v) 0,1% (w/v) 10% (v/v)	Tris/HCl pH6,8 DTT SDS Bromphenolblau Glyzerin
Laemmli-Färbelösung:	0,2% (w/v) 0,05% (w/v) 42,5% (v/v) 5% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie Blue R 250 (Serva) Coomassie Blue G 250 (Serva) Ethanol Methanol 100%ige Essigsäure

### 2.5.3 *Blue native*-Elektrophorese

Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie Blue G-250 an Proteine deren eine Trennung in einem nativen Polyacrylamidgel erfolgen. Bei der *Blue native* (BN)-Elektrophorese befindet sich der Farbstoff im Kathodenpuffer und kann an die Proteine in den Probenaschen binden, um eine Einwanderung in die Gelmatrix zu erlauben. Die Methode wurde von Schagger vorgestellt [Schagger *et al.*, 1991; Schagger & von Jagow, 1994] und eignet sich für die Analyse der Molmasse, des oligomeren Zu-

standes und der Reinheit von Proteinen. Sie wurde für wasserunlösliche Membranproteine entwickelt und bedient sich eines diskontinuierlichen nativen Polyacrylamidgels mit einem Gradienten unterschiedlicher Steilheit.

Um eine Anpassung an das Trennproblem monomerer und dimerer *EcoRI* zu erreichen, wurden verschiedene Parameter variiert (vergleiche 3.1.1.1).

Die Gellösungen für die Herstellung des Gradienten werden vorbereitet, wobei die höher konzentrierte Lösung bis zu 35% (w/v) Glycerin enthält (siehe unten für die Herstellung eines Gradienten 8%-16%, Vernetzungsgrad  $T=4,5\%$ ). Die Gellösung wird in einen Gradientenmischer geeigneter Größe überführt und nach Start der Polymerisation zwischen zwei vorbereitete Glasplatten (95x65x1mm) geleitet. Anschließend wird ein Sammelgel (4%) aufgegossen. Polymerisation bei 4°C über mehrere Stunden resultiert in erhöhter Bandenschärfe. Vor dem Einbau in eine vertikale Elektrophoresekammer sollten die Taschen markiert werden, da sie sonst vor dem Hintergrund des blauen Kathodenpuffers nur schwer erkennbar sind.

Vor dem Auftrag werden die Proben mit gleichem Volumen BN-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wird bei 4°C und konstant 15mA ausgeführt und beendet, wenn die blaue Pufferfront die untere Pufferkammer erreicht.

Das Gel wird zum Entfärben in kochende 7%ige Essigsäure (w/v) überführt. Dabei werden die Proteine denaturiert und in der Gelmatrix fixiert.

BN-Gelpuffer: (5fach)	250mM 2,5M	BisTris/HCl pH7,0 (4°C) Aminokapronsäure
BN-Trenngel 16%:	1080µl 1146µl 600µl 174µl	Bisacrylamid (2%, w/v) Acrylamid (40%, w/v) 5fach BN-Gelpuffer Glycerin
BN-Trenngel 8%:	480µl 576µl 600µl 1646µl	Bisacrylamid (2%, w/v) Acrylamid (40%, w/v) 5fach BN-Gelpuffer ddH <sub>2</sub> O
BN-Sammelgel 4%:	180µl 294µl 600µl 1926µl	Bisacrylamid (2%, w/v) Acrylamid (40%, w/v) 5fach BN-Gelpuffer ddH <sub>2</sub> O

BN-Kathodenpuffer:	50mM	Trizin
	15mM	BisTris/HCl pH7,0 (4°C)
	0,02% (w/v)	Coomassie Blue G250
BN-Anodenpuffer:	50mM	BisTris/HCl pH7,0 (4°C)
BN-Auftragspuffer: (2fach)	50mM	BisTris/HCl pH7,0 (4°C)
	15% (w/v)	Glyzerin

## 2.5.4 Immunoblot

Eine spezifische Identifizierung von Proteinen auch in einem Gemisch (zum Beispiel einem Zellaufschluß) ist durch Antikörper möglich. Dafür werden die zu untersuchenden Proteine nach elektrophoretischer Trennung auf einen geeigneten Träger überführt (*Western blot*). Als Membran dient Polyvinylidendifluorid (PVDF, Immobilon™, Firma Millipore). Die im Gel enthaltenen Proteine werden elektrophoretisch auf die Membran transferiert und immobilisiert, um sie für den Antikörper zugänglich zu machen. Die Immunreaktivität des Proteins bleibt erhalten. Die primären Antikörper werden in einem zweiten Schritt durch einen mit Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP, Sigma) gekoppelten (sekundären) Antikörper erkannt.

Western blot: Die zu untersuchenden Proteine werden mit einem Laemmli-Gel getrennt (siehe 2.5.2). Das *Blot*-Papier (Whatman *Blot*-Papier, GB003, Scheicher & Schüll) wird in *Transblot*-Puffer eingeweicht, die Membran nach Befeuchten mit Methanol in *Transblot*-Puffer/30% Methanol (v/v) äquilibriert.

Der *Transfersandwich* wird in der Apparatur (*Semidry-blotter* „Pegasus“, Firma Phase) zusammengesetzt (3 Lagen *Blot*-Papier, Polyacrylamidgel, Membran, 6 Lagen *Blot*-Papier). Der anodische *Blot* wird für 1h bei 0,8mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche ausgeführt (Spannung etwa 10V).

Nach Abschluß des *Blots* kann das Gel mit Laemmli-Färbelösung gefärbt werden, um die Transfereffizienz zu überprüfen. Ebenso ist die Verwendung eines farbigen Proteinstandards möglich (Rainbow™ Coloured Protein Molecular Weight Marker, Amersham).

### Antikörperspezifische Färbung:

- (i) Blockieren der unspezifischen Bindungsplätze auf der Membran mit TBS/3%-Magermilchpulver (2h RT oder über Nacht bei 4°C)
- (ii) dreifaches Waschen mit je 20ml TBS (5min, RT)
- (iii) Inkubation mit dem ersten Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen wt-*EcoRI* vom Kaninchen) in TBS/1% Magermilchpulver

- (2h RT oder über Nacht bei 4°C)
- (iv) zweifaches Waschen mit je 20ml TBS/0,05% Tween (5min, RT)
  - (v) dreifaches Waschen mit je 20ml TBS (5min, RT)
  - (vi) Inkubation mit dem zweiten Antikörper (*Goat anti-rabbit* IgG gekoppelt mit HRP) in TBS/1% Magermilchpulver (2h RT oder über Nacht bei 4°C)
  - (vii) zweifaches Waschen mit je 20ml TBS/0,05% Tween (5min, RT)
  - (viii) dreifaches Waschen mit je 20ml TBS (5min, RT)
  - (ix) Überführung der Membran in die Färbelösung (je eine Messerspitze Kobalt(II)chlorid und 3,3-Diaminobenzidin-4HCl·2H<sub>2</sub>O in 100ml TBS), Start der Reaktion mit 50µl 30%igem Wasserstoffperoxid
  - (x) Stoppen der Reaktion durch Schwenken der Membran in Wasser

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

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

## 2.5.5 Circular dichroismus

In der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie werden die unterschiedlichen Absorptionen von Proteinsekundärstrukturen des rechts-*R*- und links-*S*-zirkulär polarisierten Lichts in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen. Chirale Moleküle treten mit einfach polarisiertem Licht so in Wechselwirkung, daß die *R*- und *S*-Wellen unterschiedlich stark absorbiert und gebrochen werden. Gegenüber dem einfallenden Strahl ergibt sich so eine veränderte Polarisationssebene.

Das CD-Spektrum kann über den Gehalt der Hauptsekundärstrukturen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und *Random coil*) eines Proteins in Lösung Auskunft geben. Die Spektren reiner  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter und eines statistischen Knäuels bei Poly-L-Aminosäuren sind bekannt. Sie werden als Standard verwendet, um den Prozentsatz jeder Form der Sekundärstruktur in Proteinen aus dem CD-Spektrum zu errechnen [Johnson, 1988; Johnson, 1990].

Die Spektren werden in einem Jobin-Yvon Dichrograph R.J. Mark III zwischen 190 und 250nm aufgenommen (Küvettdicke 0,01-0,05cm), gespeichert und danach mit einem Kurvenanpassungsprogramm [Geiger *et al.*, 1989] ausgewertet. Simulation der sich aus den Parametern ergebenden Kurven erlaubt einen Vergleich mit dem gemessenen Spektrum [Chen *et al.*, 1972].

## 2.5.6 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation kombiniert Zentrifugation mit Spektralphotometrie. Dadurch ist die Messung der lokalen Absorption einer Proteinlösung in Abhängigkeit von der Drehzahl möglich. Bei einer analytischen Gleichgewichts-Ultrazentrifugation wird durch eine niedrige Drehzahl ein Gleichgewicht zwischen der Diffusion und der Sedimentation der Teilchen eingestellt. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradient in der Meßzelle, der ein Maß für ihre Molmasse darstellt. Daher eignet sich diese Methode für die Analyse des Dimerisierungszustandes der *EcoRI*.

Die photometrische Messung in der Zentrifugenzelle kann für Proteine zwischen 220nm und 280nm erfolgen. Daher muß sich das Protein in einem spektroskopisch unauffälligen Puffer befinden, um die Absorption messen zu können.

Die zu untersuchende Probe wird gegen einen spektroskopisch unauffälligen Puffer dialysiert. Nach Befüllen der Zellen findet die Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Optima XL-A, Beckmann) im Vakuum bei Raumtemperatur statt.

Die Auswertung der Zentrifugationsläufe erfolgt mit dem Programm Akkuprog (Kindler, 1997).

Dialysepuffer UZ2:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	800mM	NaCl
	10mM	MgCl <sub>2</sub>

Dialysepuffer UZ3:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	800mM	NaCl

## 2.5.7 Enzymatischer Abbau des Hexahistidintags

Carboxypeptidase A (CPA) ist eine Exopeptidase, die sukzessiv Aminosäurereste vom C-Terminus eines Proteins oder Peptides abspaltet. Diese Proteaseaktivität stoppt an basischen Aminosäuren. Dadurch kann CPA zur enzymatischen Entfernung des Hexahistidintags eingesetzt werden [Hochuli, 1988]. *EcoRI* besitzt ein endständiges Lysin, dessen basische Eigenschaft ein Fortschreiten der Carboxypeptidaseaktivität unterbinden und einen effizienten Abbau der C-terminalen Histidinreste ermöglichen sollte.

CPA hat ein Molekulargewicht von 33kDa und ist somit im gleichen Molekulargewichtsbereich wie das *EcoRI*-Monomer. Um eine Abtrennung der Peptidase nach der Reaktion zu gewährleisten, wurde ein Enzym gewählt, das an einer festen Matrix immobilisiert wurde. So ist sie durch einfache Zentrifugation aus dem Reaktionsansatz

entfernbar. Außerdem ist ein Einsatz des Enzyms als Säulenmaterial möglich, bei der idealer Weise der Affinitätstag beim Durchlauf durch das Säulenmaterial abgedaut wird.

Die Aktivität der CPA wird zu  $6 \cdot 10^{-3}$  U pro Mikroliter Agarose (Sigma) angegeben. Dabei hydrolysiert 1u des Enzyms  $1 \mu\text{mol}$  Substrat pro Minute bei  $30^\circ\text{C}$ .

5-20pmol wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> werden in *EcoRI*-Standard-Spaltpuffer mit einer definierten Menge Carboxypeptidase A versetzt (verdünnt mit Sephadex G-25, Ausschlußgrenze 5000Da, Pharmacia) und unter bestimmten Reaktionsbedingungen inkubiert (zum Beispiel 5min bei Raumtemperatur). Die Reaktion wird durch Sedimentation der CPA unterbrochen,  $1 \mu\text{l}$  der Reaktionslösung 1:100 mit 20mM Tris/HCl pH7,5 verdünnt und in eine Spaltkinetik mit  $\lambda$ -DNA eingesetzt (siehe 2.5.10). Das restliche Protein kann auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) untersucht oder einer affinitätschromatographischen Trennung des Proteingemischs unterzogen werden (Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose zum Binden der Proteinanteile mit nicht abgebautem Hexahistidintag).

*EcoRI* Standard-Spaltpuffer: 20mM Tris/HCl pH7,5  
50mM NaCl  
10mM  $\text{MgCl}_2$

## 2.5.8 Peptide mapping mit Trypsin

Trypsin ist eine Endopeptidase, die eine Polypeptidkette an der C-terminalen Seite von Arginin- oder Lysinresten spaltet. Die Spaltgeschwindigkeit ist von der Zugänglichkeit der Peptidbindung abhängig und variiert somit von Protein zu Protein.

Das verwendete Enzym (Boehringer Mannheim) hat eine Aktivität von 110U/mg. Es spaltet die Restriktionsendonuklease *EcoRI* in 37 Fragmente (22 Lysine und 14 Arginine im wt-Enzym). Davon weisen zehn eine Länge größer als elf Aminosäuren auf, die restlichen Fragmente sind Polypeptide aus ein bis neun Aminosäuren. Die großen Fragmente haben folgende Molekulargewichte:

5048, 2241, 2054, 2049, 1979, 1705, 1700, 1693, 1621, 1304g/mol

Die Reaktion wird mit Trypsin-Inhibitor aus Hühnereiweiß (Sigma) im Mengenverhältnis 1:1 gestoppt. Als Stammlösungen werden jeweils 5mg/ml Trypsin und Trypsin-Inhibitor in entionisiertem Wasser verwendet. Die Lösungen werden aliquotiert, eingefroren, und sollten nach einmaligem Gebrauch nicht wieder verwendet werden.

0,5 $\mu\text{g}$  (16,5pmol) wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> werden im molaren Verhältnis Trypsin : *EcoRI* = 1 : 10 in *EcoRI*-Standard-Spaltpuffer in variablem Volumen für

eine definierte Zeit inkubiert und durch die Zugabe von 16,5pmol Trypsin-Inhibitor (10facher Überschuß zu Trypsin) gestoppt. Die Reaktionsansätze werden mit Laemmli-Auftragspuffer (siehe 2.5.2) versetzt.

Die elektrophoretische Trennung erfolgt auf einem Trizingel in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Das Trenngel wird zwischen vorbereitete Glasplatten (95x65x1mm) bis etwa 2cm unter den Rand gegossen und sofort vorsichtig mit Ethanol überschichtet, um einen waagerechten Abschluß des Gels zu erhalten. Nach der Polymerisation wird der Alkohol abgegossen, die Geloberfläche an der Luft getrocknet und anschließend das Sammelgel gegossen. Das Gel wird anschließend in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die Elektrophorese erfolgt bei konstant 30mA.

Trizin-Gelpuffer: (3fach)	3M 0,3% (w/v)	Tris/HCl pH8,45 SDS
Trizin-Anodenpuffer: (5fach)	1M	Tris/HCl pH 8,9
Trizin-Kathodenpuffer: (5fach)	0,5M 0,5M 0,5% (w/v)	Tris Trizin SDS pH8,5 (nicht einstellen)
Trizin-Trenngel 16%:	27,5ml 17ml 5,5ml	30% AA (w/v), 0,8% BisAA (w/v) Tricin-Gelpuffer (3fach) ddH <sub>2</sub> O
Trizin-Sammelgel 5%:	1,6ml 3,3ml 5,1ml	30% AA (w/v), 0,8% BisAA (w/v) Tricin-Gelpuffer (3fach) ddH <sub>2</sub> O

## 2.5.9 Gelretardations-Assay

Zur Bestimmung der Bindungskonstante eines Proteins an DNA kann die Tatsache ausgenutzt werden, daß proteingebundene DNA in einem nativen Polyacrylamidgel gegenüber freier DNA verändertes Laufverhalten zeigt (Retardation). Bei Verwendung eines radioaktiv markierten Substrates kann durch eine Quantifizierung der gebundenen DNA bei einer gegebenen Proteinkonzentration unter Berücksichtigung des Verhältnisses von Protein zu DNA die Bindungskonstante ermittelt werden.

Als Substrat für die Bestimmung der spezifischen DNA-Bindungskonstante der Restriktionsendonuklease *EcoRI* dient ein 174bp langes PCR-Produkt, das in der

Mitte die Erkennungssequenz enthält. Als *Template* für die PCR (siehe 2.3.11) dient pBR322, das mit *Bam*HI linearisiert wurde (siehe 2.3.2). Tabelle 2.6 führt die Sequenzen der *Primer* auf.

Tab. 2.6: Sequenzen der PCR-*Primer* für die Herstellung des Substrates für den Gelretardations-Assay

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

In einem 50µl-PCR-Ansatz werden neben dem Reaktionspuffer 20ng pBR322 (linearisiert mit *Bam*HI), jeweils 1µl der *Primer* (50µM), 5µl dNTP-Lösung (je 5mM) und 2U native *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung des PCR-Produktes werden 10µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Amersham) zum Ansatz zugefügt.

Tabelle 2.7 gibt die Reaktionsbedingungen wider.

Tab. 2.7: PCR-Bedingungen für die Herstellung des Substrats für den Gelretardations-Assay

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

Nach der PCR-Reaktion wird das Produkt mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die zu untersuchenden *Eco*RI-Mutanten werden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-40nM mit 1nM PCR-Produkt im Bindungspuffer inkubiert (30min RT). Der Reaktionsansatz enthält 10% (w/v) Glycerin, um die Proben auf das Gel aufzutragen.

Die Gellösung (6% in 0,5fach TTE) wird zwischen vorbereitete Glasplatten gegossen (20x20x0,5cm). Nach der Polymerisation wird es in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer dient 0,5fach TTE, der Vorlauf beträgt 30min bei 20mA. Die elektrophoretische Trennung der Proben erfolgt bei 20mA für 2,5-3h.

Bindungspuffer:	20mM	Tris/HCl pH7,5
	50mM	NaCl
	10mM	EDTA
TTE: (20fach)	1,8M	Tris/HCl pH7,5
	575mM	Taurin
	2,7mM	EDTA

### 2.5.10 Bestimmung der Spaltaktivität von *EcoRI*

Für die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität wird als Standardsubstrat eine Mutante des  $\lambda$ -Bakteriophagen (cl857 Sam7, 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l, Boehringer Mannheim) verwendet. Sie hat eine Länge von 48502bp. *EcoRI* spaltet diese  $\lambda$ -DNA unter Standardbedingungen spezifisch an fünf Positionen. Das kanonische Spaltpattern enthält Fragmente der Länge:

21226bp, 7421bp, 5804bp, 5643bp, 4878bp und 3530bp.

Die elektrophoretische Trennung der Fragmente erfolgt durch ein 0,8%iges Agarosegel (siehe 2.3.6.1).

Die internationale Einheit U ist für Restriktionsenzyme diejenige Enzymmenge, die 1 $\mu$ g  $\lambda$ -DNA/60 $\mu$ l Reaktionsansatz innerhalb einer Stunde bei optimaler Reaktionstemperatur vollständig umsetzt. Die spezifische Aktivität ergibt sich aus der Aktivität des Enzyms bezogen auf den Proteingehalt (in U/mg).

Die kinetische Charakterisierung von Mutanten umfaßt die Bestimmung der spezifischen Aktivität und die Beschreibung des Spaltverhaltens unter verschiedenen Bedingungen. Die Standardbedingungen für wt-*EcoRI* sind aus einer Reihe von Optimierungen an pH-Wert, Magnesium- und Salzkonzentration hervorgegangen [Woodhead *et al.*, 1981]. Der Standardansatz enthält 50mM NaCl, wobei bis 100mM keine Einbuße in der Spaltaktivität des wt-Enzyms festzustellen ist. Je nach NaCl-Konzentration der Enzymlösung ist der Einsatz von NaCl-freien Spaltpuffern nötig, damit sich in der Spaltung vergleichbare Bedingungen ergeben. Daher sind die NaCl-Konzentrationen in den Pufferzusammensetzungen in Klammern angegeben.

Enzymverdünnungen werden in 20mM Tris/HCl des verwendeten pH-Wertes vorgenommen. Abweichende Reaktionsbedingungen werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

In einem 15 $\mu$ l-Aliquot des Spaltansatzes sind neben 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l  $\lambda$ -DNA, eine definierte Enzymmenge in einem Spaltpuffer in einfacher Konzentration enthalten.

Die Reaktion wird durch Zusatz der Enzymlösung gestartet und bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wird ein Ali-

quot von 15µl entnommen und durch Zugabe von 5µl Agaroseauftragspuffer gestoppt.

Nach Ablauf der Kinetik werden die Proben für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt. 17,5µl eines Zeitwertes werden auf ein 0,8%iges Agarosegel (siehe 2.3.6.1) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Spaltungen von Plasmid-DNA zur Ermittlung der Spaltaktivität oder -eigenschaften wurde mit pUC18 durchgeführt. Es besitzt eine singuläre *EcoRI*-Spaltstelle in der *Multiple cloning site*.

Für die Spaltung werden pro Zeitwert 10nM Plasmid-DNA und die gewünschte Menge Enzym (zum Beispiel 40nM) im Spaltpuffer bei 37°C inkubiert. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion durch 5µl Agaroseauftragspuffer gestoppt und auf einem 2%igen Agarosegel (siehe 2.3.6.1) elektrophoretisch getrennt.

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

Mangan-Spaltpuffer: (10fach)	200mM (500mM 10mM	Tris/HCl pH7,5 NaCl) MnCl <sub>2</sub>
---------------------------------	-------------------------	--

Niedrigsalz-Spaltpuffer: (10fach)	200mM (50mM 10mM	Tris/HCl pH8,8 NaCl) MgCl <sub>2</sub>
--------------------------------------	------------------------	--

Agaroseauftragspuffer: (5fach)	0,25M 1,2% 25% 0,1% 0,1%	EDTA SDS Saccharose Bromphenolblau Xylen Cyanol FF
-----------------------------------	--------------------------------------	--

### 2.5.11 Bestimmung der Spaltaktivität von Proteinen mit der Mutation L158D

In einem Agarosegel erscheint die Spaltaktivität der Proteine mit der Mutation L158D als unspezifische Nickaseaktivität, die DNA ohne erkennbares Spaltmuster degradiert. Um eine Charakterisierung der Spalteigenschaften zu ermöglichen, muß eine Zuordnung der Spaltung zu der gespaltenen DNA-Sequenz erfolgen. Dies ist

durch die radioaktive Markierung eines DNA-Substrates möglich, dessen Spaltprodukte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert werden können. Als Substrat für Markierung und Spaltung wurden pRIF309+ und pUC8 verwendet, da eine große Anzahl von *Primern* für die Markierung beider DNA-Einzelstränge vorhanden ist. Um die Zuordnung der gespaltenen DNA-Sequenzen zu ermöglichen, werden die Plasmidspaltungen direkt mit einer DNA-Sequenzierung (siehe 2.3.10) mit dem gleichen *Primer* verglichen. Beide Markierungsreaktionen sollten parallel durchgeführt werden, nur mit dem Unterschied, daß der Terminationsmix für das Spaltsubstrat keine Didesoxynukleotide enthalten darf, damit das gesamte Plasmid als Doppelstrang für die Spaltung zur Verfügung steht. Auf dem denaturierenden Gel sind daher die Kettenabbrüche durch die Didesoxynukleotide in der Sequenzierung vergleichbar mit den Spaltungen im DNA-Strang durch die Mutanten.

Die Plasmid-DNA wird zunächst für Substrat- und Sequenzierreaktion gleich behandelt: Nach Denaturierung und Waschen (siehe 2.3.10) folgen das *Annealing* des *Primers* und das *Labelling* (Einbau des radioaktiven Schwefels). Die DNA wird in Sequenzieransatz und Substratansatz getrennt und separat weiter behandelt. Die Sequenzierreaktion wird wie unter 2.3.10 beschrieben ausgeführt.

Der Substratansatz wird mit einem Nukleotidgemisch versetzt, das keine Didesoxynukleotide enthält, und für 15min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNA-Polymerase wird der Ansatz für 10min auf 65° erhitzt. Das so markierte Plasmid kann in eine Spaltreaktion mit dem wt-Enzym oder einer Mutante eingesetzt werden.

Nukleotidgemisch:	150µM	dNTPs
	40mM	Tris/HCl pH7,5
	50mM	NaCl

## 2.5.12 *Cross link*-Experimente

Durch bifunktionelle Reagenzien, die spezifisch mit bestimmten Seitenketten in Proteinen reagieren können, lassen sich Proteinteile durch einen *Cross link* kovalent verbinden. Dabei gibt es für verschiedene Seitenketten (Thiol- oder Aminogruppen) unterschiedliche Reagenzien, die im Abstand der reaktiven Gruppen und Reaktionsbedingungen variieren. Zusätzlich ist es bei einigen *Cross link*-Reagenzien möglich, sie nach erfolgter Reaktion wieder zu spalten.

*Cross link*-Reagenzien sind geeignet, Informationen über den Oligomerisierungsgrad eines Proteins zu liefern, da sie einander nahekommende Proteinteile kovalent verbinden. Im Fall der Restriktionsendonuklease *EcoRI* sollte eine *Cross link*-Reaktion

zwischen den beiden Untereinheiten des homodimeren Enzyms möglich sein, während die entsprechende Reaktion bei der überwiegend monomer vorliegenden Mutante L158D nur durch die zufällige Verknüpfung zweier einzelner Moleküle vorkommen sollte.

Die gezielte Konstruktion von Cysteinmutanten macht eine kovalente Verknüpfung beider Untereinheiten durch den spezifischen *Linker* Bismaleimidohexan (BMH) möglich.

Tabelle 2.8 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *Cross link*-Reagenzien und ihre Eigenschaften, Abbildung 2.2 zeigt die Moleküle und ihre Reaktionsschemata.

Tab. 2.8: *Cross link*-Reagenzien und ihre Eigenschaften

<i>Cross link</i> -Reagenz	Reaktive Gruppe	Zielgruppe	Länge [Å]	spaltbar
Bismaleimidohexan (BMH)	Maleimid	-SH	16,1	nein
Dimethylsuberimidat (DMS)	Imidoester	-NH <sub>2</sub>	11,0	nein
Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat) (EGS)	NHS*-Ester	-NH <sub>2</sub>	16,1	ja
Glutardialdehyd	Aldehyd	-NH <sub>2</sub>	4,5	nein

\*NHS: N-hydroxysuccinimid

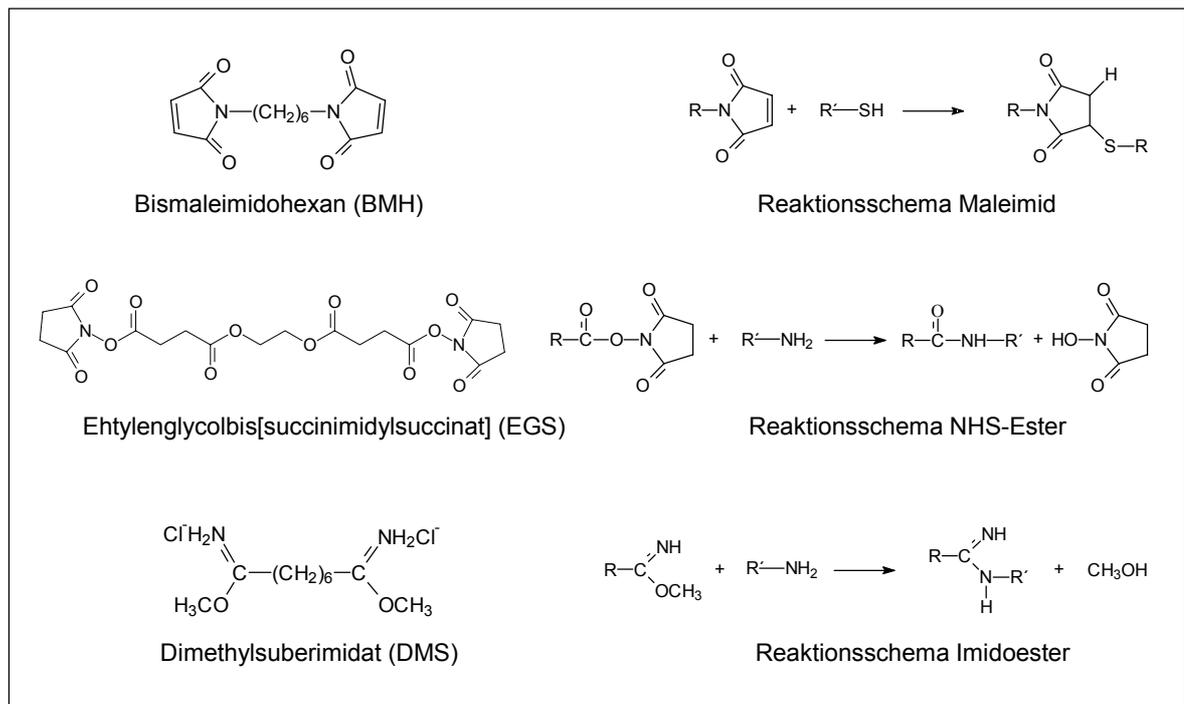


Abb. 2.2: *Cross link*-Reagenzien und ihre Reaktionsschemata

Glutardialdehyd wurde von der Firma Sigma bezogen, die übrigen von Pierce. Alle *Cross link*-Reagenzien werden unmittelbar vor der Reaktion frisch angesetzt werden.

Bismaleimidohexan: Die Proteine, die einem *Cross link* mit BMH unterzogen werden sollen, werden gegen BMH-Reaktionspuffer dialysiert, da die Proteinlösung keine Reduktionsmittel wie beispielsweise DTT enthalten darf. EDTA im Reaktionspuffer verhindert die Reoxidation der Thiolgruppen. Nach der Dialyse wird zunächst die Funktionalität des Enzyms durch eine Bestimmung der Spaltaktivität verifiziert (siehe 2.5.10).

BMH wird aus einer Stammlösung (5-10mM in DMSO) frisch mit DMSO auf eine Konzentration verdünnt, mit der sich der gewünschte molare Überschuss des *Cross link*-Reagenzes im Ansatz ergibt (zum Beispiel äquimolar oder 10facher Überschuss). Dabei muß bedacht werden, daß die Konzentration des zugesetzten DMSO 10% (v/v) nicht überschreiten sollte.

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wird die Reaktion mit 1/10 Volumen einer 1mM DTT-Lösung gestoppt.

Dimethylsuberimidat: 20-40pmol Protein (wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>) werden mit einem molaren Überschuss DMS (30-200fach) aus einer frisch verdünnten Lösung in einem Puffer pH-Wert 8,5 (200mM TEA oder KP<sub>i</sub>) für 3-4h bei Raumtemperatur inkubiert.

Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat): 20-40pmol Protein (wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>) werden mit einem Überschuss EGS (20-50fach) aus einer frisch verdünnten Lösung in 200mM HEPES-Puffer pH8,0 für definierte Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10µl 2M Tris/HCl pH7,5 gestoppt.

Glutardialdehyd: In einem 10µl-Ansatz werden 20-40pmol Protein in 200mM HEPES pH7,5 mit einem Überschuss Glutardialdehyd (200-200000fach) versetzt und für eine definierte Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5µl Laemmli-Auftragspuffer gestoppt. Für einige Proben hat sich ein größeres Reaktionsvolumen (bis 1,5ml) als vorteilhaft erwiesen.

Nach der *Cross link*-Reaktion werden die Proben gegebenenfalls mit TCA gefällt und auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) auf ihre Proteinbanden analysiert.

BMH-Reaktionspuffer: 20mM	KP <sub>i</sub> pH7,0
300mM	NaCl
10mM	EDTA

### 2.5.13 Gelfiltration

Mit der Gelfiltration können Proteinanteile nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Diese Methode ist daher geeignet, den Aggregationszustand eines Proteins zu ermitteln. *EcoRI* zeigt in der Gelfiltration ein retradierendes Verhalten, so daß die Banden gegen ein kleineres Molekulargewicht verschoben sind.

Die Durchführung der Gelfiltrationen wird nach der von Geiger *et al.* (1989) beschriebenen Vorgehensweise angefertigt. Der Stammpuffer enthält 800mM NaCl, so daß der Anteil an monomerem Enzym zurückgedrängt ist. Als Standardsubstanzen werden BSA ( $M_R=68\text{kDa}$ ) und Lysozym ( $M_R=14,4\text{kDa}$ ) verwendet. Das Säulenmaterial besteht aus Superose HR12 (Pharmacia).

## 2.6 Charakterisierung der DNA-Bindung der *Extended chain*-Peptide

Es konnte gezeigt werden, daß ein Peptid, welches die Aminosäuren des *Extended chain*-Motivs enthält (Met137 bis Arg145), schwach aber spezifisch an GAATTC bindet [Jeltsch *et al.*, 1995b]. In Erweiterung der Experimente wurden Varianten dieses Peptids auf einer Membran synthetisiert. In Analogie zu den Experimenten von 1995 wurden ausgewählte Aminosäuresequenzen als freie Peptide synthetisiert. Sowohl die Peptidbibliothek als auch die freien Peptide wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ronald Frank (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF, Braunschweig) mit der freundlichen Unterstützung von Frau Andrea Tiepold und Herrn Dr. Werner Tegge.

### 2.6.1 Bindungsexperimente im Zwei-Phasen-System

#### 2.6.1.1 Synthese der Peptidbibliothek

Die Synthese der Peptide erfolgt nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/tert-Butyl-Methode (Fmoc/tBu-Methode) [Fields & Noble, 1990]. Dabei werden die zu synthetisierenden Peptide auf einer Membran (Whatman 540) verankert und anschließend mithilfe der *Spot*-Synthese zum Beispiel in einem Raster von 25x17 hergestellt (ASP222, Abimed Analysen-Technik GmbH) [Frank, 1992; Frank & Overwin, 1996].

Zunächst wird das gesamte Papier mit Carbonylimidazol aktiviert, anschließend mit Jeffamin 500 (O,O'-Bis(2-aminopropyl)-polyethylenglycol 500) beladen. Die Reaktionszeit beträgt bis zu 24 Stunden. Dabei wird die Bedeckungsdichte mit dem Jeffamin in regelmäßigen Abständen durch eine Farbreaktion überprüft.

Die Membran wird anschließend mit Alanin bedeckt. Verwendet wird ein Aminosäurederivat mit einer Fmoc-Schutzgruppe. Nach einer Reaktionszeit von mehreren Stunden wird der Filter über Nacht blockiert (*Capping*, 2% (v/v) Essigsäureanhydrid in DMF), um die restlichen freien Bindungsplätze zu besetzen. Die Membranen sind so lagerbar (-20°C).

Direkt vor der Synthese der Peptide wird der Filter durch die Base Piperidin entschützt (20% (v/v) Piperidin in DMF), mit DMF und Ethanol gewaschen und getrocknet. Die *Spots* auf dem Filter werden mit Fmoc- $\beta$ -Ala-Ester betüpfelt, die restlichen freien Reaktionsstellen mit der *Capping*-Reaktion blockiert. Der Filter wird mit DMF gewaschen, mit Piperidin entschützt und erneut mit DMF gewaschen. Es folgt eine Färbung der Membran mit Bromphenolblau in DMF, so daß sich die *Spots* durch eine Bindung des Farbstoffs an freie Aminogruppen blau färben. Die Membran wird erneut mit Ethanol gewaschen.

In der Synthese wiederholen sich folgende Schritte:

- (i) Aktivierung der Aminosäurederivate vor jedem Syntheseschritt mit Diisopropylcarbodiimid
- (ii) Auftrag der Aminosäurederivate durch den *Spotter* (Abimed) in mehreren Runden auf die entsprechenden *Spots* (Farbumschlag von blau zu gelb); Reaktionszeit etwa 30min unter einer Glasplatte
- (iii) *Capping* der Membran (siehe oben)
- (iv) Waschschrift mit DMF
- (v) Entschützen der Aminosäuren mit Piperidin
- (vi) Waschschrift mit DMF
- (vii) Färbung der Membran mit Bromphenolblau
- (viii) Waschschrift mit Ethanol und Trocknung

Nach dem letzten Zyklus wird der Filter einem *Endcapping* unterzogen. Anschließend werden die Seitenschutzgruppen der Aminosäuren mit einer Lösung aus Dichlormethan, Triisobuthylsilan und Trifluoressigsäure abgespalten.

Auf diese Weise wurden zwei Membranen erstellt (zur Beladung siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2).

### 2.6.1.2 Bindung von Oligonukleotiden an die Peptidbibliothek

Die Bindung von DNA an die Peptidbibliothek wurde mit zwei selbstkomplementären Oligonukleotiden durchgeführt, die mit einem Biotin markiert sind. BioDickAT enthält die kanonische *EcoRI*-Sequenz GAATTC, während BioAntiDickAT eine unspezifische Sequenz enthält (siehe Tabelle 2.9). Die Farbreaktion zum Nachweis des

biotinylierten Oligonukleotids erfolgt über ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Streptavidin bindet mit hoher Affinität an die Biotinmarkierung des Oligonukleotids. Es ist kovalent mit Alkalischer Phosphatase verbunden, das für eine Farbreaktion eingesetzt werden kann.

Tab. 2.9: Sequenzen der Oligonukleotide für die Filterbindung

Name	Sequenz
BioDickAT	TATAGAATTCTAT
BioAntiDickAT	TATACTTAAGTAT

Vorbereitung des Filters:

- (i) Eingefrorene Filter werden 15min auf Raumtemperatur aufgetaut. Kommt der Filter nicht direkt aus dem *Stripping* (siehe unten), wird er mit einigen Tropfen Ethanol angefeuchtet.
- (ii) dreifaches Waschen mit je 25ml Bindungspuffer (vergleiche Tabelle 2.10)

Bindung des Oligonukleotids:

- (i) Ansatz der gewünschten Konzentration Oligonukleotid in 8ml Bindungspuffer
- (ii) Inkubation des Oligonukleotids auf dem Filter für 3h
- (iii) dreifaches Waschen mit je 25ml Bindungspuffer

Antikörperreaktion und Färbung:

- (i) Zusatz von 20µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Dianova) in 8ml Bindungspuffer
- (ii) Inkubation des Konjugats auf dem Filter für 90min
- (iii) zweifaches Waschen mit je 25ml Bindungspuffer
- (iv) zweifaches Waschen mit je 25ml CBS
- (v) Zufügen von 25ml Färbelösung, gelegentlich schwenken, Färbung beobachten
- (vi) kurzes Waschen mit 25ml PBS (Stop der Reaktion)
- (vii) Waschen mit 25ml PBS

CBS:	1,4M	NaCl
(10fach)	27mM	KCl
	10mM	Citronensäure-1-hydrat
		pH7,0 mit NaOH, autoklavieren

Färbelösung:	5mM	MgCl <sub>2</sub>
	40µl	BCIP-Stammlösung (6mg/100µl DMF)
	60µl	MTT-Stammlösung (5mg/100µl 70% DMF (v/v))
		ad 10ml CBS
PBS:	1,4M	NaCl
(10fach)	27mM	KCl
	43mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	14mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Stripping des Filters:

- (i) zweifaches Waschen des Filters mit ddH<sub>2</sub>O
- (ii) Waschen mit DMF
- (iii) Überführen des Filters in ein verschließbares Plastikgefäß, anschließend Beschallung im Ultraschallbad, bis sich jegliche Färbung von den Filtern gelöst hat (5-10min)
- (iv) Waschen mit DMF
- (v) dreifaches Waschen mit ddH<sub>2</sub>O
- (vi) dreifaches Waschen mit Puffer A; je Waschschritt 5min Schwenken und 5min Ultraschall
- (vii) dreifaches Waschen mit Puffer B
- (viii) dreifaches Waschen mit Ethanol

Puffer A:	8M	Harnstoff
	1% (w/v)	SDS
	0,5%	Mercaptoethanol

Puffer B:	10% (v/v)	Essigsäure
	50% (v/v)	Ethanol
	40% (v/v)	H <sub>2</sub> O

Als Bindungspuffer wurden verschiedene Puffersysteme auf ihre Eignung getestet. Tabelle 2.10 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzungen.

Tab. 2.10: Puffersysteme für die Oligonukleotidbindung an die Filter; Die Änderungen in der Zusammensetzung im Vergleich zum Standard-Bindungspuffer sind *kursiv* hervorgehoben.

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Standard-Bindungspuffer	200mM Tris/HCl pH7,5 50mM NaCl 20mM EDTA
Bindungspuffer mit Tween	200mM Tris/HCl pH7,5 50mM NaCl 20mM EDTA <i>0,05% Tween 20 (Merck)</i>
Bindungspuffer mit 100mM NaCl	200mM Tris/HCl pH7,5 <i>100mM NaCl</i> 20mM EDTA <i>0,05% Tween 20</i>
Bindungspuffer mit 200mM NaCl	200mM Tris/HCl pH7,5 <i>200mM NaCl</i> 20mM EDTA <i>0,05% Tween 20</i>
Phosphatpuffer mit 100mM NaCl	<i>20mM <math>KP_i</math> pH7,5</i> 100mM NaCl 20mM EDTA <i>0,05% Tween 20</i>
Bindungspuffer mit Magnesium	200mM Tris/HCl pH7,5 50mM NaCl <i>10mM <math>MgCl_2</math></i>
Bindungspuffer mit 100mM NaCl und Magnesium	200mM Tris/HCl pH7,5 <i>100mM NaCl</i> <i>1mM <math>MgCl_2</math></i>

Die quantitative Auswertung der erhaltenen Färbungen der *Spots* erfolgte nach *Scannen* des Filters (HP ScanJet 4C, Programm: DeskScan 2.3) mit der Software E.A.S.Ywin (Firma Herolab).

## 2.6.2 DNA-Bindungsexperimente in Lösung

### 2.6.2.1 Peptidsynthese

Ebenso wie die immobilisierten Peptiden wurden die löslichen nach der Fmoc/tBu-Methode hergestellt. Die Synthese erfolgte an Harz (Tentagel S RAM, etwa 0,25mmol/g; AMS222, Abimed Analysen-Technik GmbH). Die Synthese fand nach Angaben des Herstellers statt. Zur Aufreinigung diente RP-HPLC (Merck-Hitachi LaChrom L7000) mit einer Kieselgel-Matrix mit Octadecyl-Modifikation (ET 250/8/4

NUCLEOSIL 300-7 C18 Säule, Macherey & Nagel). Die Analyse der *Peak*-Fraktion erfolgte durch MALDI-MS (Kratos-Shimadzu MALDI III).

Tabelle 2.11 gibt eine Übersicht über Sequenzen und Konzentrationen Peptide (vergleiche auch Abbildung 3.33). Die Gruppe Arg145 stellt die Referenzgruppe dar, auf die die Messungen bezogen wurden. Änderungen in der Sequenz im Vergleich zu diesen Peptiden sind fett und kursiv dargestellt.

Bidentate Peptide werden mit unterschiedlichen Diaminosäuren dargestellt. Dabei findet die Peptidsynthese jeweils an den endständigen NH<sub>2</sub>-Gruppen statt. Peptide, die mit Diaminopropionsäure (DAP, eine CH<sub>2</sub>-Gruppe zwischen den Aminogruppen) hergestellt wurden, tragen das Suffix C1, während Peptide, die über Lysin (vier CH<sub>2</sub>-Gruppen zwischen den Aminogruppen) verbunden sind, mit C4 abgekürzt werden. Monodentate Peptide sind ebenfalls gekennzeichnet.

Tab. 2.11: Sequenzen der freien *Extended chain*-Peptide

Peptid-gruppe	Peptid	Sequenz (N → C)	Molgewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
Arg145	Arg145 <sub>mono</sub>	MAAGNAIER	1846	2,5
	Arg145 <sub>C1</sub>	(MAAGNAIER) <sub>2</sub> DAP	2013	2,5
	Arg145 <sub>C4</sub>	(MAAGNAIER) <sub>2</sub> Lys	2055	2,5
α4	α4 <sub>mono</sub>	<b>WDG</b> MAAGNAIERk	1459	10
	α4 <sub>C1</sub>	( <b>WDG</b> MAAGNAIER) <sub>2</sub> DAP	2646	3,33
	α4 <sub>C4</sub>	( <b>WDG</b> MAAGNAIER) <sub>2</sub> Lys	2688	3,33
His147	His147 <sub>C1</sub>	(MAAGNAIER <b>SH</b> ) <sub>2</sub> DAP	2329	10
	His147 <sub>C4</sub>	(MAAGNAIER <b>SH</b> ) <sub>2</sub> Lys	2287	10
Lys148	Lys148 <sub>C1</sub>	(MAAGNAIER <b>SHK</b> ) <sub>2</sub> DAP	2717	10
	Lys148 <sub>C4</sub>	(MAAGNAIER <b>SHK</b> ) <sub>2</sub> Lys	2759	10
Ser143	Ser143 <sub>mono</sub>	MAAGNASERk	1076	10
	Ser143 <sub>C1</sub>	(MAAGNASER) <sub>2</sub> DAP	1877	10
Gly145	Gly145 <sub>mono</sub>	MAAGNAIER <b>GGG</b> k	1272	10
	Gly145 <sub>C1</sub>	(MAAGNAIER <b>GGG</b> ) <sub>2</sub> DAP	2272	10
Gly142	Gly142 <sub>mono</sub>	MAAGN <b>GGG</b> k	874	10
	Gly142 <sub>C1</sub>	(MAAGN <b>GGG</b> ) <sub>2</sub> DAP	1476	10

### 2.6.2.2 Bindung freier Peptide an Plasmid-DNA

Die Bindung der freien Peptide an Plasmid-DNA sollte spezifisch an *EcoRI*-Spaltstellen auftreten. Eine Möglichkeit zur Detektion ergibt sich daher durch den Vergleich

von Spaltaktivitäten mit und ohne Peptidzusatz in der Reaktion verschiedener Enzyme, deren Erkennungssequenzen mit der *EcoRI*-Schnittstelle überlappen.

Als Plasmid wurde pACYC184 verwendet, das über eine *EcoRI*-Schnittstelle verfügt. Diese überlappt mit einer *BspEI*-Spaltstelle, während eine andere Schnittstelle des gleichen Enzyms nicht überlappend ist (vergleiche Abbildung 3.33).

Die Spaltungen wurden mit *EcoRI* (10U/µl, Fermentas) und *BspEI* (10U/µl, NEB) in den mitgelieferten Reaktionspuffern durchgeführt.

Für die Spaltung werden pro Zeitwert 1µg Plasmid-DNA, 2U Enzym (*EcoRI* oder *BspEI*) und unterschiedliche Konzentrationen (bis 0,5mM) Peptid eingesetzt. Vor Zugabe des Enzyms werden DNA und Peptid bei 37°C für 5min vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Nach Inkubation über bestimmte Zeit bei 37°C wird die Reaktion durch 5µl Agaroseauftragspuffer gestoppt und auf einem 0,8%igen Agarosegel (siehe 2.3.6.1) elektrophoretisch getrennt.

### 2.6.2.3 Bindung freier Peptide an Oligonukleotide

In einem Spaltansatz eines Enzyms mit Plasmid-DNA ist die Anzahl der spezifischen Spaltstellen wesentlich geringer als die möglichen unspezifischen Bindungsplätze. Um das Verhältnis in Richtung spezifischer Bindungsstellen zu begünstigen, ist der Einsatz von Oligonukleotiden nötig, die durch ihre geringere Länge eine im Verhältnis wesentlich höhere Anzahl von spezifischen Bindungsstellen als Plasmide zur Verfügung stellen.

Um Sequenzen zu erhalten, die durch die *Extended chain*-Peptide gebunden werden, wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, das eine *EcoRI*-Erkennungssequenz enthält, die mit Erkennungssequenzen anderer Restriktionsendonukleasen (*BspEI* und *XbaI*) überlappt. Zusätzlich wurden die Erkennungssequenzen von *EcoRV*, *BfaI*, *Hinfi* und *HpaII* eingefügt (insgesamt 29bp). Als Vergleich für die unspezifische Bindungskapazität der Peptide wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, daß nur eine *HpaII*-Schnittstelle trägt (24bp). Sequenzen und Restriktionsspaltstellen beider Oligonukleotide sind in Tabelle 2.12 aufgeführt, eine detailliertere Dargestellung befindet sich in Abbildung 3.32.



TTE: (20fach)	1,8M 575mM 2,7mM	Tris Taurin EDTA pH $\approx$ 9 (nicht einstellen)
PAA-Auftragspuffer: (5fach)	10mM 50mM 50% (v/v) 0,2% (w/v)	Tris/HCl pH8,0 EDTA Glyzerin Azorubin

Die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgt mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97. Dabei wird die Spaltgeschwindigkeit des Enzyms auf dem Oligonukleotid ohne Peptidzusatz für die Berechnung zu Grunde gelegt. Anhand der prozentualen Abnahme der Produktbande mit zunehmender Peptidkonzentration kann die Bindungskonstante berechnet werden.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Untersuchungen der Dimerisierungseigenschaften von wt-*EcoRI* und Mutanten der Position Leu158 in Abhängigkeit vom Affinitätstag

Nach der Klonierung des Hexahistidintags an die Restriktionsendonuklease *EcoRI* wurden umfangreiche Experimente mit beiden Enzymen durchgeführt, um die Auswirkungen des Affinitätstags auf die Eigenschaften des Enzyms zu untersuchen [Rotzal, 1992]. Neben der angestrebten einfacheren Aufreinigung des fusionierten Proteins zeigte sich jedoch eine erhöhte Aggregationsneigung. Sonst verhielten sich beide Enzyme identisch im Hinblick auf CD-Spektrum, spezifische DNA-Spaltaktivität, Wechselzahl des Umsatzes auf Plasmid- und Oligonukleotidebene sowie Assoziationskonstanten für spezifische und unspezifische DNA-Sequenzen. Diese Methoden werden mit hohen Enzymverdünnungen ausgeführt.

Erste Hinweise, daß wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> andere Eigenschaften aufweist, wurden bei Untersuchungen in *Stopped flow*-Experimenten ermittelt [Kühn, 1995]. Dabei wurden bei der DNA-Bindung von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> keine Änderungen mehr in der Proteinfluoreszenz festgestellt, wie sie für das unmodifizierte Enzym beobachtet werden. In einer Gelfiltration mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> konnten keine eindeutigen Bandenpositionen detektiert werden, so daß keine Auflösung zwischen monomeren und dimeren Proteinanteilen möglich war [Vennekohl, 1996]. Bei DNA-Bindungsstudien mit der Methode der Nitrozellulosefilterbindung wurde ermittelt, daß eine verdünntere Lösung des Proteins zu einer höheren Bindungskonstante führt [Küster, 1998].

Alle Ergebnisse deuten stark darauf hin, daß mit der Fusion des Hexahistidintags an die Restriktionsendonuklease *EcoRI* die natürliche Aggregationsneigung des Proteins verstärkt wird, so daß Untersuchungsmethoden, die hohe Proteinkonzentrationen benötigen, durch die Assoziation der Moleküle gestört werden. Daher ist die Untersuchung dieser Phänomene und eine Fusion mit einem anderen, weniger einflußreichen Affinitätstag erforderlich. Verbunden mit der Problematik des Hexahistidintags ist die Charakterisierung der Mutante L158D<sub>His6</sub>, die schon während meiner Diplomarbeit (1996) hergestellt wurde.

### 3.1.1 Untersuchungen zum Dimerisierungszustand von L158D<sub>His6</sub>

Als homodimeres Enzym verfügt die Restriktionsendonuklease *EcoRI* über eine Dimerisierungsfläche, die hydrophober Natur ist. Daran beteiligt ist die Aminosäure Leu158 der einen Untereinheit, die Ile230 der anderen gegenübersteht. Während meiner Diplomarbeit (1996) ergaben sich starke Hinweise, daß bei den Proteinvarianten, die die Mutation L158D tragen (die Einzelmutante und beide Doppelmutanten L158D-I230D und L158D-I230K), die Dimerisierungsfähigkeit stark eingeschränkt ist. Bei erhöhter Temperatur (Raumtemperatur und 37°C) sowie in verdünnter Lösung sind diese Enzyme nicht länger in der Lage, DNA spezifisch zu binden und zu spalten. Sie zeigen eine unspezifischen Nickase-Aktivität, die eindeutig als Enzymeigenschaft nachgewiesen wurde. Dies deutet darauf hin, daß die Dimere auseinanderfallen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zum Nachweis dieses monomeren Zustandes weitergeführt.

#### 3.1.1.1 *Blue native*-Elektrophorese

Bei der *Blue native*-Elektrophorese erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dabei wird die Einwanderung in die Gelmatrix durch die Anlagerung des positiv geladenen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 gefördert, der sich im Kathodenpuffer befindet. Somit ist eine elektrophoretische Trennung von sonst ungeladenen Proteinen möglich. Auch für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* stellte die native Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein Problem dar, da das Protein keine Einwanderung in die Gelmatrix zeigte [Geiger, 1990]. Die Methode wurde für die Analyse von nativen Membranproteinkomplexen entwickelt [Schägger *et al.*, 1991] und scheint für die Untersuchung des Dimerisierungsstatus der *EcoRI* geeignet.

Eine Schwierigkeit bei der *Blue native*-Elektrophorese ist die Dokumentation der Banden. Die Proteine laufen gemeinsam mit dem blauen Kathodenpuffer in die Gelmatrix ein, so daß das Gel nach der Elektrophorese ebenfalls blau gefärbt ist. Banden in Höhe der erwarteten monomeren Proteinanteile (31kDa) laufen dabei sehr nahe der Lauffront des Kathodenpuffers. Bei nur kleinen Proteinmengen ist die Färbung der Bande nicht stark genug, um sie gegen den bläulichen Hintergrund nachzuweisen. Zusätzlich ist die Anfärbbarkeit von Proteinen von der Faltung ihrer Polypeptidkette abhängig, da der Farbstoff an hydrophobe Proteinanteile bindet.

Als Standardproteine zur Ermittlung der Molmassen der *EcoRI*-Mutanten wurden Bovines Serumalbumin (BSA, 68kDa) und Ovalbumin (45kDa) verwendet. In der Elektrophorese zeigte BSA eine größere Laufstrecke als wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>, obwohl es ein größeres Molekulargewicht aufweist, während Ovalbumin nur unwesentlich weiter lief als BSA. Es läßt sich schließen, daß das Laufverhalten nicht nur von der Proteingröße

abhängig ist und daher eine Abschätzung der Molmasse mit dem hier verwendeten Gelsystem (siehe 2.5.3) entgegen der Angaben der Autoren nicht möglich.

Zur Ermittlung des Dimerisierungszustandes der Mutante L158D<sub>His6</sub> ist daher ein Vergleich zu einer denaturierten wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> der sinnvollste Ansatz. Nach einer Inkubationszeit von 15min bei 65°C wurde das wt-Enzym neben dem unbehandelten Protein einer Elektrophorese unterzogen. Dabei war keine Bande auf dem Gel zu erkennen. Da sich der Farbstoff an die hydrophoben Bereiche des Proteins bindet, ist es möglich, daß die Denaturierung dazu führte, daß diese Bereiche sich in das Innere des Proteins verlagert haben. In einem weiteren Ansatz wurde das wt-Protein für drei Tage bei 37°C inkubiert. In der Elektrophorese erschien es unverändert. Daher ist nur ein Vergleich zwischen dem nativen wt-Enzym und den Mutanten möglich. Abbildung 3.1 zeigt die elektrophoretische Trennung.

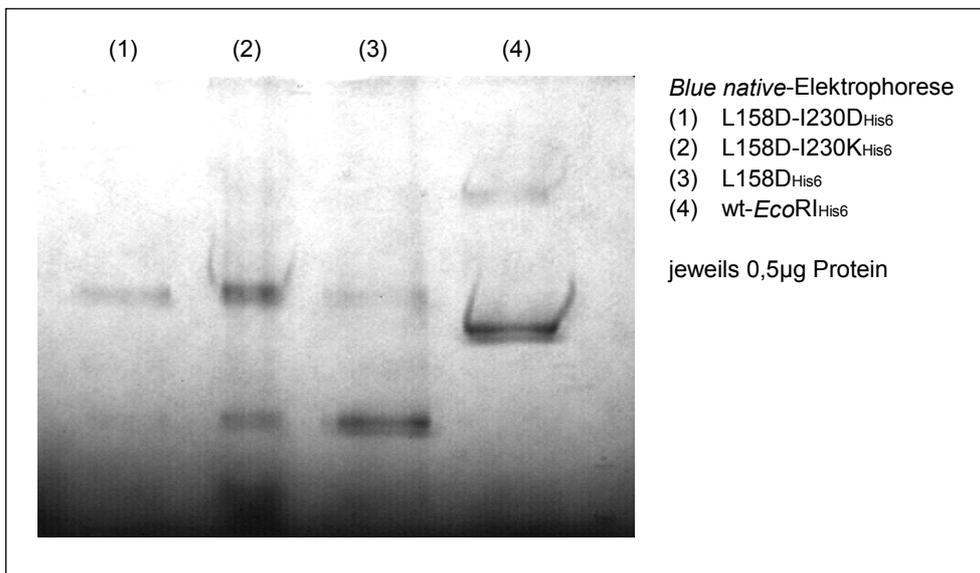


Abb. 3.1: Blue native-Elektrophorese mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und den Proteinen mit der Mutation L158D

Bei der Trennung von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> sind zwei Banden zu erkennen. Dabei ist die Hauptbande dem dimeren Enzym zuzuordnen, während es sich bei der schwächeren Bande um die tetramere Form des Proteins handelt.

Bei den Proteinvarianten mit der Mutation L158D sind ebenfalls zwei Banden zu erkennen, die jedoch nicht auf der Höhe der wt-Banden lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um die monomeren Anteile dieser Mutanten (untere Bande kurz vor der Lauffront) und um dimeres Protein, das vermutlich über die unveränderte Kontaktfläche der Tetramerisierung entsteht. Für diese Spezies ist ein verändertes Laufverhalten zu erwarten, da die Form des Proteins von der globulären Struktur des üblichen Dimers abweichen muß.

Bei der Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> findet sich das meiste Protein in der Bande für das monomere Enzym, während bei der Doppelmutante L158D-I230K<sub>His6</sub> mehr dimeres Protein zu erkennen ist. Die Proteinkonzentration der Mutante L158D-I230D<sub>His6</sub> ist mit

0,8µM zu niedrig, um genügend Protein auf das Gel auftragen zu können, daher ist der monomere Anteil nicht zu erkennen.

Elektrophoretische Trennungen anderer Mutanten (zum Beispiel I230K<sub>His6</sub>) zeigen nur eine Bande für dimeres Protein in der Höhe des wt-Enzyms.

Die Ergebnisse stützen daher die Annahme, daß die Mutante L158D<sub>His6</sub> hohe Anteile monomeren Proteins enthält.

### 3.1.1.2 Peptide mapping mit Trypsin

Der Abbau eines Proteins durch eine Endopeptidase und die anschließende elektrophoretische Analyse der Proteinfragmente wird als *Peptide mapping* bezeichnet. Dabei entstehen Bandenmuster, die für ein Protein charakteristisch sind. Die Anteile des zu verdauenden Proteins, die dem Lösungsmittel zugewandt sind, werden dabei zuerst angegriffen.

Die Endopeptidase Trypsin spaltet ein Protein an der C-terminalen Seite von Lysin und Arginin. Daher wird wt-*EcoRI* in 37 Fragmente gespalten, die längsten Fragmente haben dabei folgende Größen:

5048, 2241, (2054 und 2049), 1979, (1705, 1700, 1693), 1621, 1304g/mol.

Die Mutante L158D<sub>His6</sub> liegt überwiegend monomer vor (siehe 3.1.1.1). Daher ist anzunehmen, daß andere Teile des Proteins dem Lösungsmittel zugewandt sind, und sich so im Trypsinverdau ein anderer Verlauf des Bandenmusters bis zum Erreichen des Endspaltmusters ergibt. Abbildung 3.2 stellt die entstehenden Fragmente nach dem Verdau beider Proteine (siehe 2.5.8) gegenüber.

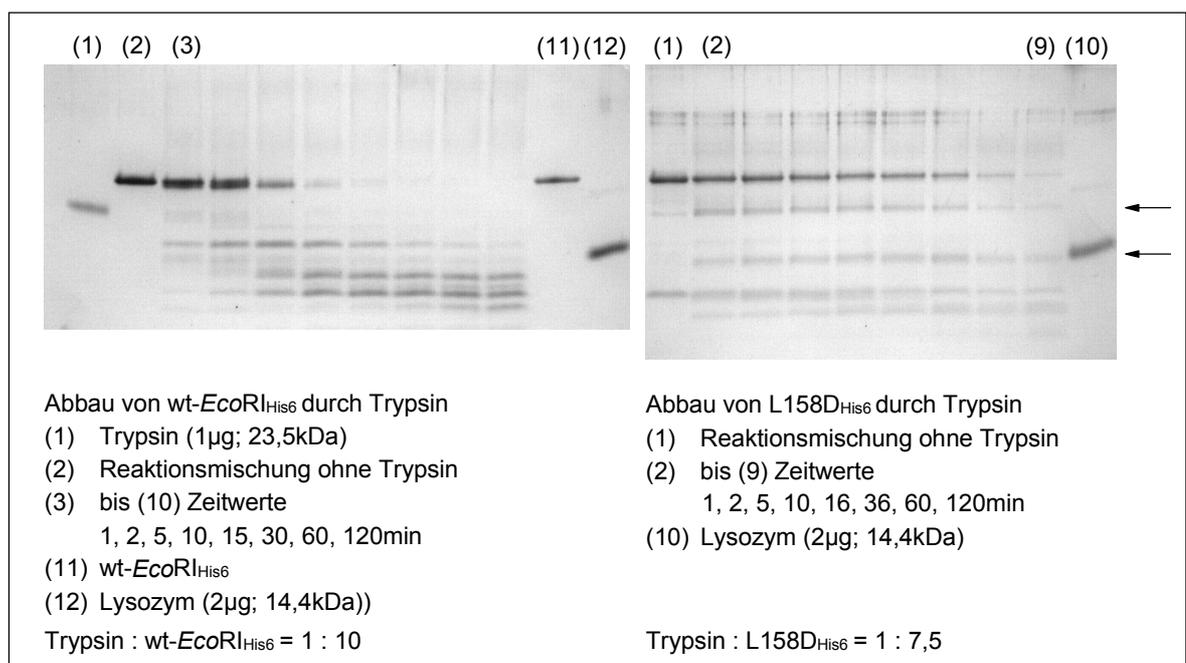


Abb. 3.2: Abbau von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und L158D<sub>His6</sub> durch Trypsin; Die Pfeile markieren Proteinbanden, die nur bei der Mutante vorkommen.

Während beim wt-Enzym nach 15min Reaktionszeit die Ausgangsbande bei 31kDa vollständig abgebaut war, schreitet der Abbau der Mutante weniger schnell voran. Noch im letzten Zeitwert (2h) ist ein Teil der ursprünglichen Bande zu sehen, obwohl ein höheres Verhältnis von Trypsin zu *EcoRI* gewählt wurde. Hier ist der Selbstabbau der Peptidase deutlich zu erkennen (oberer Pfeil). Beim Abbau der Mutante entsteht schon mit dem ersten Zeitwert eine Bande (unterer Pfeil), die auf der Höhe von Lysozym (14,4kDa) läuft. Sie tritt auch bei der Spaltung von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> auf, allerdings nur in sehr geringer Menge.

Es ist auffallend, daß nach der initialen Spaltung durch Trypsin das entstehende Bandenmuster von L158D<sub>His6</sub> über einen langen Zeitraum unverändert erscheint. Erst in den letzten Zeitwerten ist eine Veränderung der Banden zu sehen. Dies spricht für eine globuläre Struktur von L158D<sub>His6</sub>, die nur schwer für die Peptidase zugänglich ist.

Eine höhere *EcoRI*-Konzentration zur Erzeugung stärkerer Banden konnte nicht gewählt werden, da Trypsin bei höheren Glyzerinkonzentrationen im Reaktionsansatz gehemmt wird. Bis zu 46% (v/v) Glycerin wurden toleriert, danach sinkt die Spaltgeschwindigkeit der Peptidase drastisch ab. Dialyse gegen nicht glyzerinhaltige Puffer verdünnten die Lösungen so stark, daß keine Erhöhung der Proteinkonzentration im Test möglich war.

Der proteolytische Abbau der Mutante L158D<sub>His6</sub> führte zu den gleichen Endprodukten wie für das wt-Enzym, allerdings traten andere Zwischenprodukte auf. Dies spricht für eine veränderte Enzymstruktur der Mutante. Aus dem langsameren Abbau ist zu schließen, daß es sich um eine für die Peptidase schlecht zugängliche, globuläre Struktur handelt, in der die durch die monomere Natur entstehenden hydrophoben Proteinanteile ins Innere verlagert wurden.

### 3.1.1.3 *Cross link*-Experimente

Durch eine *Cross link*-Reaktion lassen sich Proteinteile kovalent miteinander verbinden, die sich in räumlicher Nähe befinden. Im wt-Enzym haben die Untereinheiten direkten Kontakt zueinander, so daß eine solche Verknüpfung möglich sein sollte. Bei der Mutante L158D<sub>His6</sub>, die überwiegend im monomeren Zustand vorliegt, ist eine geringere *Cross link*-Rate zu erwarten, da sich zwei Moleküle nur diffusionsbedingt in der Lösung begegnen. Durch eine Analyse der *Cross link*-Produkte sollte daher ein Rückschluß auf den Dimerisierungszustand der Mutante möglich sein.

Verwendet wurden mehrere *Cross link*-Reagenzien, die spezifisch mit Aminogruppen reagieren. Findet eine Reaktion zwischen Gruppen unterschiedlicher Untereinheiten statt, so muß sich durch die kovalente Verknüpfung ein größeres Molekulargewicht ergeben, das in einem denaturierenden Gelsystem detektierbar ist. In die *Cross link*-Experimente wurden nur Proteine mit Hexahistidintag eingesetzt.

### Dimethylsuberimidat (DMS)

DMS überspannt einen Abstand von 11Å (siehe Abbildung 2.2). Es verknüpft als homobifunktionelles Reagenz Aminogruppen von Lysinen mit zwei Imidoestern als reaktiven Gruppen. Es wurde in verschiedenen Puffersubstanzen (TAE und  $KP_i$  bei pH8,5) und Konzentrationsverhältnissen getestet (siehe 2.5.12; Abbildung 3.3).

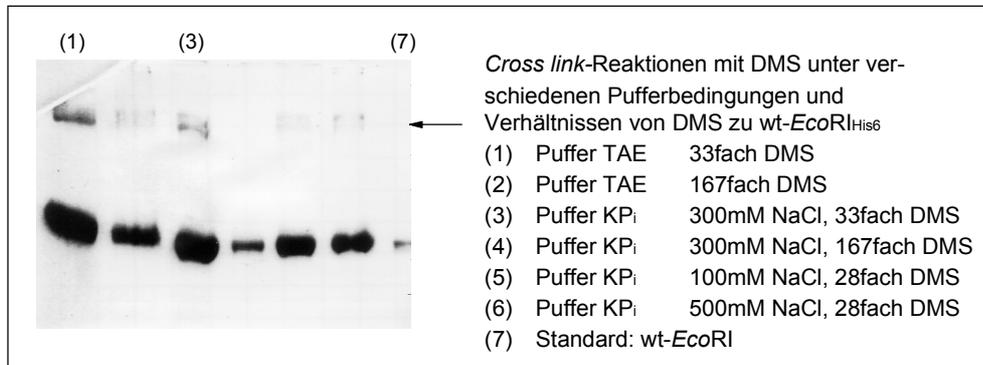


Abb. 3.3: *Cross link*-Reaktionen von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> mit DMS in verschiedenen Pufferbedingungen und Konzentrationsverhältnissen

Bei einem 33fachen Überschuß von DMS zu wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ist in beiden Puffern eine deutliche Bande höheren Molekulargewichts zu sehen. Ein größerer Überschuß an *Cross link*-Reagenz ist für die Reaktion ungünstig, da in beiden Puffern die Bandenstärke bei 167fachem Überschuß geringer ist als bei 33fachem. Vermutlich sind durch den hohen Überschuß von DMS höhere Aggregate entstanden, die nicht in das Gel eingewandert sind. Bei einem mittleren Überschuß (28fach) wurden verschiedene Salzkonzentrationen in der Reaktionsmischung getestet (100mM und 500mM statt 300mM). Es zeigt sich jedoch eine verschlechterte Ausbeute im Vergleich zu 300mM NaCl.

Weitere Versuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen von DMS zu *EcoRI*, anderen Puffersubstanzen (HEPES, Trizin) und pH-Werten (8,0 und 8,5) durchgeführt. Es konnte jedoch keine Erhöhung der Ausbeute an *Cross link*-Produkt erzielt werden.

### Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat) (EGS)

Das *Cross link*-Reagenz EGS trägt die reaktiven Gruppen des NHS-Esters (N-hydroxysuccinimid-Ester) in einem Abstand von 16,1Å (siehe Abbildung 2.2). Die Reaktion findet wie bei DMS mit Aminogruppen statt.

Die *Cross link*-Reaktion wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffer (200mM HEPES pH8,5) mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> zu EGS ausgeführt (siehe 2.5.12). Abbildung 3.4 stellt die Reaktionen dar.

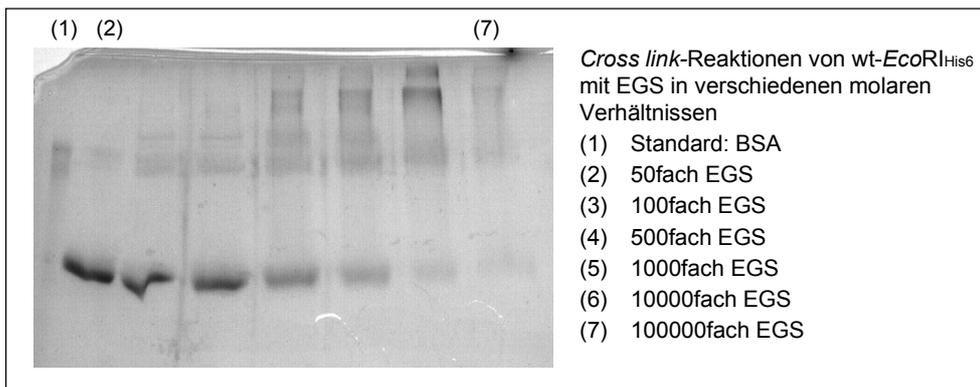


Abb. 3.4: *Cross link*-Reaktionen von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> mit EGS in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen

Mit steigendem Überschuß des *Cross link*-Reagenz nimmt die Stärke der Ausgangsbande bei 31kDa ab. Gleichzeitig ist eine Zunahme an *Cross link*-Produkten zu erkennen, die ein immer höheres Molekulargewicht aufweisen. Bei einem 10000fachen Überschuß von EGS zu wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ist kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden, allerdings nimmt auch die Stärke der Banden der höheren Molekulargewichte wieder ab. Dies spricht dafür, daß die Aggregate zu groß geworden sind, um in das Gel einzuwandern.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, daß die *Cross link*-Reaktion zwischen zwei Untereinheiten eines Homodimeren und nicht zwischen zwei getrennten Molekülen stattfindet, wurde die Reaktion in einem größeren Volumen ausgeführt. Es zeigte sich jedoch kein Einfluß auf die *Cross link*-Ausbeute.

Ein analoges Experiment wurde mit Proteinen mit L158D-Mutation ausgeführt. In einem Volumen von 50µl wurde ein 500facher Überschuß EGS eingesetzt (siehe Abbildung 3.5).

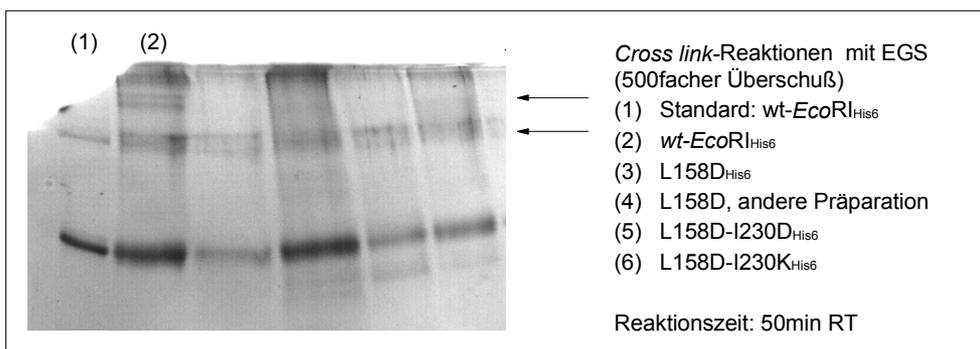


Abb. 3.5: *Cross link*-Reaktionen von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und Proteinvarianten mit der Mutation L158D mit EGS (500facher Überschuß)

Nur bei wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> entsteht eine zusätzliche Bande in einem hohen Molekulargewichtsbereich (oberer Pfeil), während bei den Proteinen mit Mutation L158D keine Bande hinzukommt. Der untere Pfeil markiert eine Verunreinigung im Gelsystem, die auch beim Standard auftritt.

### Glutardialdehyd

Problematisch bei den *Cross link*-Experimenten ist die Ausbeute an Produkt, da nur ein Bruchteil des angebotenen Proteins mit dem Reagenz reagieren. Von erhöhter Reaktivität ist Glutardialdehyd, dessen Aldehydgruppen einen Abstand von 4,5Å aufweisen (siehe 2.5.12).

Abbildung 3.6 zeigt die Reaktion von Glutardialdehyd in 200mM HEPES pH7,5 mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> in 100 bis 100000fachem Überschuß.

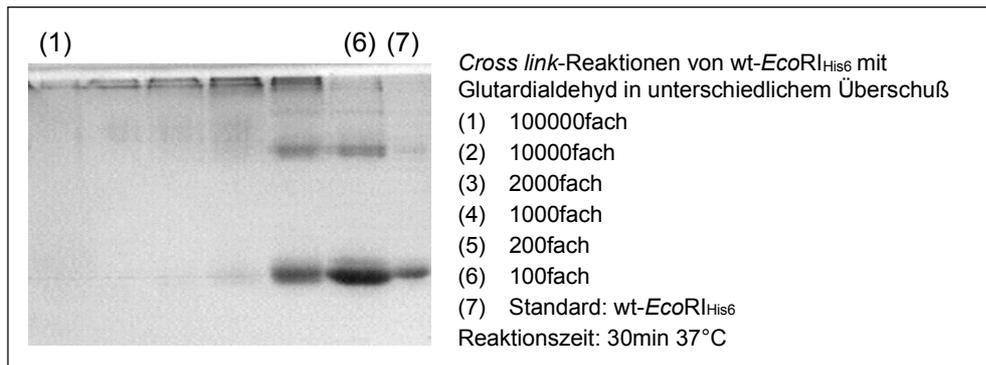


Abb. 3.6: *Cross link*-Reaktionen von Glutardialdehyd mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen

Bei hohen Überschüssen (1000- bis 100000fach) ist kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden. Allerdings sind auch keine Banden bei hohem Molekulargewicht zu sehen, so daß die Reaktion vermutlich zu sehr großen Aggregaten geführt hat, die nicht in das Gelsystem einwandern können.

Während beim 200fachen Überschuß noch Aggregate am Eintritt in das Trenngel zu sehen sind, scheint die Reaktion bei 100fachem Überschuß lediglich eine Spezies höheren Molekulargewichts ergeben zu haben. Dabei handelt es sich um das dimere Protein (vergleiche BSA-Standard in Abbildung 3.7).

Um eine bessere Reaktionseffizienz zu erhalten, wurden unterschiedliche Bedingungen getestet. Dabei erwies sich eine Reaktionstemperatur von 37°C als vorteilhaft. Eine Erhöhung des Reaktionsvolumens ergab in diesem Fall eine größere Menge an *Cross link*-Produkt. Insgesamt war jedoch die *Cross link*-Ausbeute nur schlecht reproduzierbar.

Abbildung 3.7 zeigt die Reaktionen von Glutardialdehyd mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und einigen Mutanten.

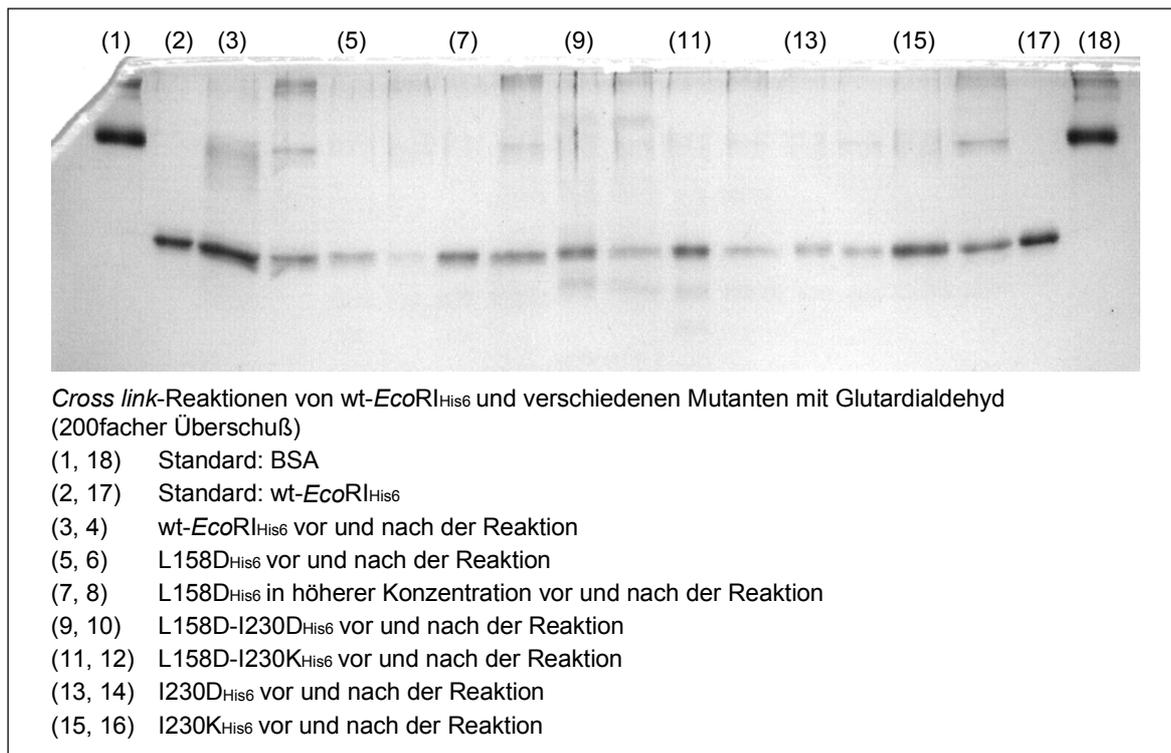


Abb. 3.7: Reaktionen von Glutardialdehyd mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und verschiedenen Mutanten

Bei wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und der Mutante I230K<sub>His6</sub> ist eine deutliche Bande im Bereich des dimeren Proteins (vergleiche BSA) zu sehen. Für I230D<sub>His6</sub> ist ein analoges Verhalten zu erwarten, jedoch ist die Proteinmenge im Test nicht ausreichend, um dies auf einem Laemmigel zu dokumentieren.

Auffällig ist, daß Proteine mit der Mutation L158D in den Bahnen nach der Reaktion weniger Protein in der Höhe der Ausgangsbande zeigen, jedoch keine deutliche Bande in Höhe des dimeren Proteins. Eine Ausnahme bildet die Reaktion der Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> in hoher Konzentration (Stammlösung 5µM), von der bekannt ist, daß sie in höherer Konzentration noch die Fähigkeit zur Spaltung aufweist.

Insgesamt zeichnen sich die *Cross link*-Experimente durch geringe Reproduzierbarkeit und Ausbeute aus, die auch durch die Aggregationsneigung der Proteine mit Hexahistidintag begründet sein kann. Im Vergleich zum wt-Enzym zeigt die Mutante L158D<sub>His6</sub> eine geringere Fähigkeit zur *Cross link*-Reaktion, was auf einen veränderten Dimerisierungsstatus hinweist.

#### 3.1.1.4 Charakterisierung der Spaltaktivität der Proteine mit der Mutation L158D

Wie in meiner Diplomarbeit (1996) beschrieben wiesen die Proteine mit der Mutation L158D eine Nukleaseaktivität auf, die zum unspezifischen Abbau von DNA führt. Um eine Charakterisierung der Spaltstellen zu ermöglichen, wurde die Spaltung auf einem radioaktiv markierten Substrat durchgeführt (siehe 2.5.11). Die Markierungsre-

aktion wurde in Analogie zur DNA-Sequenzierreaktion ausgeführt, allerdings ohne Termination der Polymerisation des Einzelstrangs, so daß ein längerer markierter Doppelstrang entsteht. Daher ist der Bereich, der auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel detektiert werden kann, durch den in der Markierungsreaktion verwendeten *Primer* bestimmt. Im Vergleich zu der parallel ausgeführten Sequenzierreaktion kann durch gemeinsames Auftragen der Ansätze auf das Gelsystem die Spaltung durch die Nuklease der Sequenz des Plasmids zugeordnet werden.

Zwei Plasmide wurden als Substrat für die anschließende Spaltung durch die Proteine mit der Mutation L158D eingesetzt. Verwendet wurden pRIF309+ und pUC8, für die *Primer* für die Sequenzierung beider Einzelstränge zur Verfügung standen. Interessant ist dabei auch das Spaltverhalten an der kanonischen Sequenz.

Abbildung 3.8 zeigt die erhaltenen Spaltmuster des wt-Enzyms und der drei Proteinvarianten mit der Mutation L158D mit pUC8 als Substrat.

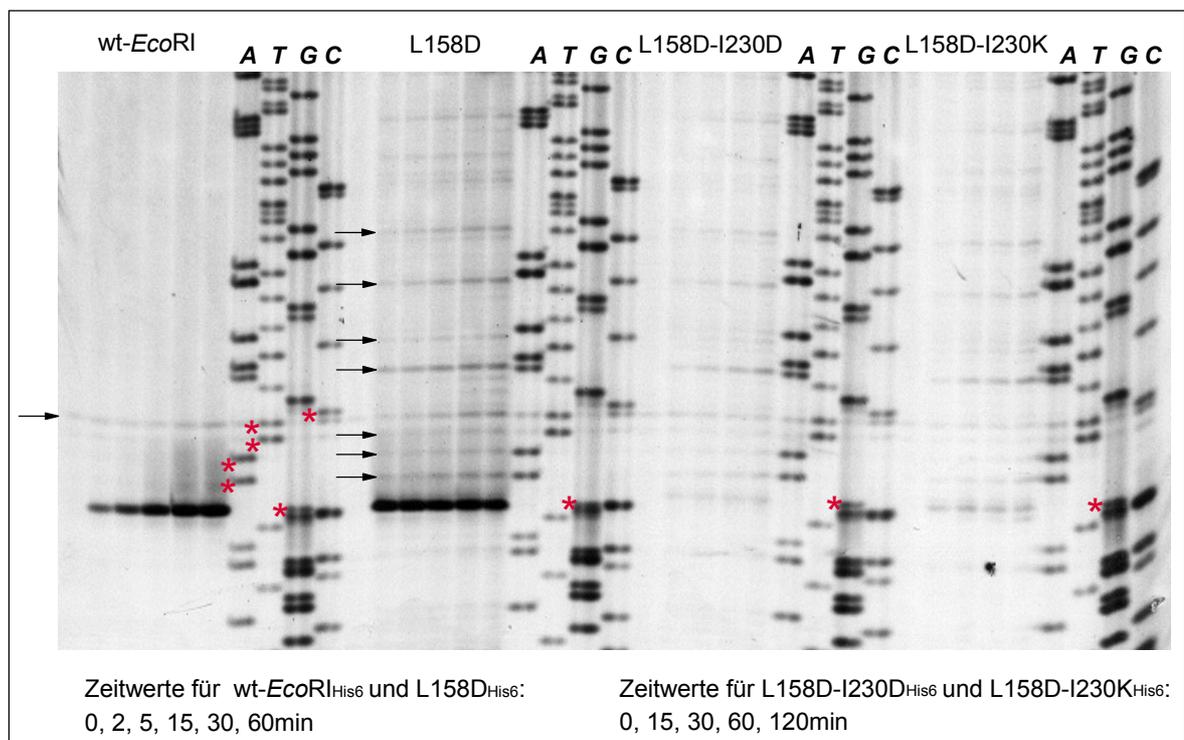


Abb. 3.8: Spaltmuster auf radioaktiv markiertem pUC8 für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und die Proteine mit der Mutation L158D

Die Zeitwerte für das wt-Enzym zeigen außer an der kognaten Sequenz (markiert durch die Sterne) keine Spaltung in diesem DNA-Bereich. Dagegen sind bei den Mutanten an vielen Sequenzen mit der Zeit zunehmende Spaltungen zu erkennen. Es wurden nur diejenigen Sequenzen für eine Auswertung herangezogen, bei denen eine eindeutige Zunahme der Bande über den Zeitbereich festzustellen war (exemplarische Markierung dieser Sequenzen bei der Mutante L158D<sub>His6</sub> mit Pfeilen im Gegensatz zu der Bande, die auch beim wt-Enzym und in den Nullwerten auftreten). Auffällig ist, daß die von den Mutanten gespaltenen Sequenzen überwiegend gleich waren. In einigen

Fällen ergaben sich Unterschiede zwischen den Mutanten, die jedoch auf die unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten zurückzuführen waren, da die beiden Doppelmутanten eine geringere Spaltaktivität aufwiesen.

Eine Spaltung der kognaten Sequenz GAATTC (markiert mit \*) erfolgt in nennenswerter Weise nur durch die Mutante L158D<sub>His6</sub>, während die anderen Mutanten diese ursprüngliche Erkennungssequenz unter den Testbedingungen kaum spalten. Die Aktivität für L158D<sub>His6</sub> auf der kognaten Sequenz ist im Vergleich zu den anderen gespaltenen Sequenzen wesentlich höher. Daraus ist zu schließen, daß bei dieser Mutante eine Rest-Erkennung vorliegt (vermutlich durch einige dimere Enzyme). Es ist jedoch auch deutlich zu sehen, daß die Mutanten auch innerhalb der Erkennungssequenz an anderer Stelle als zwischen G und A spalten.

Vergleiche zwischen den beiden Einzelsträngen eines Plasmids ergaben, daß es sich bei den Mutanten um echte Nickasen handelt, die nur einen DNA-Strang spalten. Die entsprechenden Sequenzen auf dem Gegenstrang wurde nicht gespalten.

Es wurden 76 Sequenzen erhalten, eine Aufstellung findet sich in Anhang 2. Sie haben keine Ähnlichkeit mit der kognaten Erkennungssequenz oder mit *Star*-Sequenzen. In wiederholten Experimenten ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit der Spaltungen an den markierten Stellen.

Aus einem Vergleich der durch die Mutanten gespaltenen Sequenzen läßt sich keine Konsensussequenz ermitteln. Es ist wahrscheinlich, daß sie sich nicht in ihrer Basensequenz ähneln, sondern vielmehr eine ähnlich Konformation in Lösung einnehmen, die von den Enzymen erkannt und gespalten werden kann.

### 3.1.2 Weitere Mutanten an den Positionen 158 und 230

Der Aminosäureaustausch von Leucin gegen Aspartat an der Position 158 zwingt das Enzym in eine überwiegend monomere Form. Die beiden Untereinheiten sind nicht länger in der Lage, einen Kontakt auszubilden. Sobald die Mutante der optimalen *wt-EcoRI*-Reaktionstemperatur (37°C) ausgesetzt oder die Konzentration herabgesetzt ist, fallen die Dimere auseinander, und die Nickaseaktivität wird detektierbar. Um zu untersuchen, ob die Störung in der hydrophoben Kontaktfläche durch die Ladung des Aspartatrestes hervorgerufen wird, wurde die Mutation L158N untersucht. Dieser Aminosäurerest hat den gleichen Platzbedarf, trägt aber keine negative Ladung. Zur Untersuchung des Einflusses von Ladung in der hydrophoben Kontaktfläche, wurde auch die Mutation L158H untersucht.

In der Kontaktfläche des Enzyms stehen sich die Aminosäuren Leu158 und Ile230 gegenüber (vergleiche auch Abbildungen 3.15 und 4.2). Daher wurden ebenfalls die korrespondierenden Mutanten I230N und I230H hergestellt und untersucht.

### 3.1.2.1 Herstellung und Aufreinigung der Mutanten

Die Mutanten L158N<sub>His6</sub>, L158H<sub>His6</sub>, I230N<sub>His6</sub> und I230H<sub>His6</sub> wurden durch *Gapped duplex*-Mutagenese erhalten (Mutageneseprimer und Durchführung siehe 2.3.7) und ihre Basensequenz durch Sequenzierung verifiziert (siehe 2.3.7). Nach Transformation von TGE900pEcoR4 (siehe 2.2.4) und erfolgreichem Expressionstest (siehe 2.2.5) wurden die Proteine im 500ml-Maßstab exprimiert und über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätssäule aufgereinigt (siehe 2.4.3.1). Zur stabilen Lagerung der Proteinlösungen wurden sie gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5). Tabelle 3.1 zeigt die Konzentrationen der erhaltenen Proteinlösungen.

Tab. 3.1: Konzentrationen von *EcoRI*-Mutanten der Positionen 158 und 230

Proteinvariante	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Reinheit
L158N <sub>His6</sub>	16,7	≈95%
L158H <sub>His6</sub>	12,4	≈80%
I230N <sub>His6</sub>	nicht erhalten	/
I230H <sub>His6</sub>	11,3	≈80%

Die Mutante I230N<sub>His6</sub> wurde in der Mutagenese erhalten und ihre Basensequenz verifiziert. Doch auch nach mehrmaliger Transformation von TGE900pEcoR4 konnte keine Expression des Proteins erreicht werden.

### 3.1.2.2 Charakterisierung

Eine Analyse der Spalteigenschaften der Mutanten gibt einen Hinweis darauf, welchen Einfluß die eingebrachte Mutation auf die Proteinvariante ausübt. Als Substrat dient  $\lambda$ -DNA. Die Reaktionen wurden in Standard-Spaltpuffer ausgeführt (siehe 2.5.10). Nach den Ergebnissen mit den Proteinen mit der Mutation L158D wurden die Reaktionen neben der üblichen Inkubationstemperatur (37°C) bei 16°C ausgeführt [Vennekohl, 1996].

Abbildung 3.9 stellt einige Kinetiken für die Mutante L158N<sub>His6</sub> und das wt-Enzym gegenüber.

Bei einem Absenken der Temperatur von der normalen Reaktionstemperatur (37°C) auf 16°C nimmt die spezifische Aktivität des wt-Enzyms deutlich ab (vergleiche auch Tabelle 3.2). Bei der Mutante L158N<sub>His6</sub> ist die Spaltung der DNA bei 37°C auch nach 5h nicht beendet, so daß hier keine spezifische Spaltaktivität ermittelt werden konnte. Es erfolgt vielmehr unspezifische Degradation der DNA, die in den späteren Zeitwerten erkennbar wird. Bei 16°C dagegen zeigt die Mutante L158N<sub>His6</sub> eine scheinbar höhere Aktivität, und die Spaltung ergibt das vom wt-Enzym bekannte Spaltmuster, das bis zum letzten Zeitwert stabil ist.

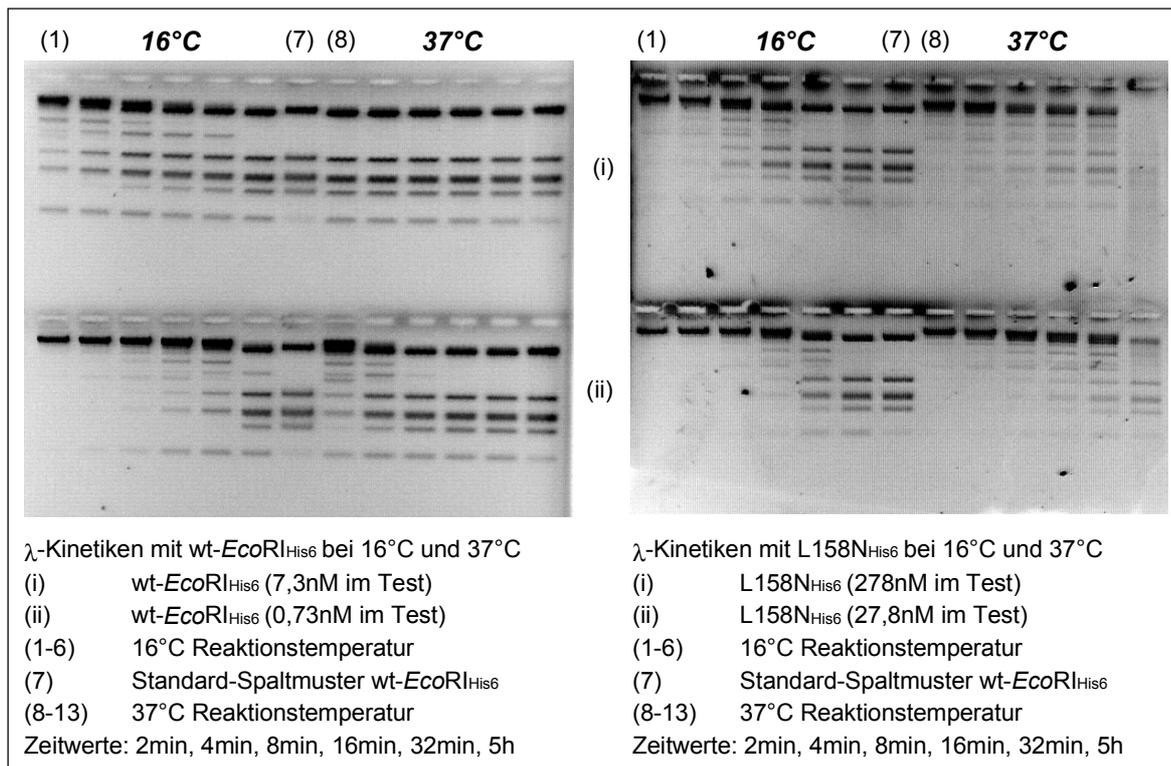


Abb. 3.9: Gegenüberstellungen der λ-Kinetiken bei 16°C und 37°C der Mutante L158N<sub>His6</sub> und des wt-Enzyms

Durch die Destabilisierung der Dimerisierungsfläche in der Mutante ist der Anteil an dimerem und somit funktionsfähigem Enzym herabgesetzt. Dieses Verhalten wurde bereits bei den Proteinvarianten mit der Mutation L158D beobachtet, die bei 37°C kein fertiges Spaltmuster erzeugen konnten [Vennekohl, 1996].

Die sich aus allen Messungen ergebenden spezifischen Aktivitäten für die Mutanten sind in Tabelle 3.2 den Aktivitäten des wt-Enzyms gegenübergestellt. Die in Klammern angegebenen Werte beziffern die Konzentration im Test, unter denen die Aktivitäten bestimmt wurden.

Tab. 3.2: Spezifische Aktivitäten der *EcoRI*-Mutanten der Positionen 158 und 230

Proteinvariante	spezifische Aktivität bei 37°C [U/mg]	spezifische Aktivität bei 16°C [U/mg]	Quotient Akt. 16°C / Akt. 37°C	Gesamtaktivierung
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	2,7·10 <sup>6</sup> (0,73nM)	7,1·10 <sup>3</sup> (7,3nM)	1/385	/
L158D <sub>His6</sub>	unspez. Nuklease	unspez. Nuklease	/	/
I230H <sub>His6</sub>	2,5·10 <sup>5</sup> (1,8nM)	4,0·10 <sup>3</sup> (3,8nM)	1/62	6
L158N <sub>His6</sub>	Bandenmuster, aber unspez. Nuklease	3,0·10 <sup>3</sup> (5,6nM)	3000	1,2·10 <sup>6</sup>
L158H <sub>His6</sub>	2,4·10 <sup>2</sup> (2μM), aber unspez. Nuklease	2,4·10 <sup>3</sup> (20,6nM)	10	3850

Durch den großen Abstand der Mutationen vom katalytischen Zentrum (siehe auch Abbildung 3.15) ist eine Beeinflussung der Katalyse unwahrscheinlich. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß die Dimere dieser Mutanten wt-Aktivität aufweisen. So ist eine Veränderung der spezifischen Spaltaktivität auf die vorhandene Anzahl von Dimeren in der Lösung zurückzuführen. Durch die Herabsetzung der Temperatur wird nicht nur die katalytische Aktivität des wt-Enzyms verlangsamt, sondern auch jene der Mutanten. Daher muß in eine Erhöhung der Aktivität zusätzlich noch die Verlangsamung der Katalyse, die für das wt-Enzym bestimmt wurde, mit eingerechnet werden (Tabelle 3.2, rechte Spalte).

Um eine Bestimmung der spezifischen Bindungskonstante für diese Mutanten zu ermöglichen, wird die Inkubation der Proteine mit DNA beim Gelretardations-Assay (siehe 2.5.9) und die anschließende Elektrophorese bei 16°C ausgeführt. Tabelle 3.3 stellt die ermittelten Bindungskonstanten zusammen.

Tab. 3.3: Spezifische Bindungskonstanten der *EcoRI*-Mutanten an den Positionen 158 und 230 bei 16°C und Raumtemperatur

Proteinvariante	spezifische Bindungskonstante bei RT [M <sup>-1</sup> ]	spezifische Bindungskonstante bei 16°C [M <sup>-1</sup> ]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	4,7·10 <sup>8</sup>	4,8·10 <sup>7</sup>
L158D <sub>His6</sub>	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
I230H <sub>His6</sub>	5,0·10 <sup>8</sup>	3,4·10 <sup>8</sup>
L158N <sub>His6</sub>	3,1·10 <sup>6</sup>	4,9·10 <sup>6</sup>
L158H <sub>His6</sub>	7,4·10 <sup>6</sup>	7,5·10 <sup>6</sup>

Die Unterschiede in den Bindungskonstanten sind nur gering. Während für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> das DNA-Bindungsvermögen um den Faktor zehn sinkt, bleibt es für die Mutante L158D<sub>His6</sub> nicht bestimmbar. Im Gegensatz dazu konnten für die Mutanten L158N<sub>His6</sub> und L158H<sub>His6</sub> Bindungskonstanten ermittelt werden, die allerdings zwischen 16°C und Raumtemperatur keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Analoges Verhalten wurde für I230H<sub>His6</sub> gemessen.

Zur Ermittlung der Sekundärstrukturelemente der Mutanten wurde CD-Spektroskopie durchgeführt. Durch eine Verunreinigung während der Aufreinigung der Mutanten konnte jedoch eine Auswertung des Spektrums um den Bereich 210nm nicht erfolgen. Daher ist keine Aussage über die Faltung der Mutanten möglich. Diese Experimente müssen mit einer neuen Enzympräparation nachgeholt werden.

### 3.1.3 Analytische Ultrazentrifugation von Hexahistidin-Fusionsproteinen

Zur Analyse des Dimerisierungszustandes eines Proteins eignet sich eine Gleichgewichtszentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge. Es ist möglich, aus dem Konzentrationsgradienten innerhalb der Zentrifugenzelle die Molekülmasse eines Proteins zu bestimmen und so einen Hinweis auf den oligomeren Zustand zu erhalten.

Nach der Dialyse der zu untersuchenden Proteine gegen einen spektroskopisch unauffälligen Puffer (UZ2, siehe 2.5.6) wurden die Zellen befüllt und einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die Zentrifugation erfolgte mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und der Mutante L158D<sub>His6</sub> bei Umdrehungszahlen von 15000U/min und 22000U/min (Meßwellenlängen 280nm und 230nm).

Die Auswertung der Meßkurven für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ergab kein spezifisches Molekulargewicht, sondern gleicht einer Lösung von Aggregaten im dynamischen Gleichgewicht, das über zehn Stunden stabil ist. Es handelt sich um reversible Umwandlungen zwischen Dimer, Tetramer, Oktamer und höheren Aggregaten. Die Auswertung für die Mutante L158D<sub>His6</sub> ergab ein analoges Gleichgewicht, das allerdings kleinere Spezies als das Dimer enthielt. Die Lösungen wiesen keine schwereren Anteile auf, die sedimentierten. Es handelt sich daher nicht um Präzipitate, die aus dem Gleichgewicht entfernt werden, sondern um natürlich vorkommende Spezies unter diesen Bedingungen (RT).

Es ist denkbar, daß es sich um eine erhöhte Aggregationsneigung des Enzyms aufgrund des Hexahistidintags und nicht um eine Eigenschaft von *EcoRI* handelt. Daher wurden sowohl wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> als auch wt-*EcoRI* gegen den Puffer UZ2 dialysiert und einer analytischen Ultrazentrifugation unterzogen bei 10000U/min und 20000U/min. Nach der Auswertung mit Akkuprog [Kindler, 1997] ergab sich für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ein mittleres Molekulargewicht von 217,5kg/mol. Das entspricht einer Assoziation von sieben Untereinheiten. Die Auswertung für das wt-Enzym ohne Affinitätstag ergab ein Molekulargewicht zwischen 70kg/mol und 87,3kg/mol, was einem Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer mit einem höheren Anteil von dimerem Protein entspricht. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen mit wt-*EcoRI* und zeigen, daß die native Aggregationsneigung durch den Affinitätstag verstärkt wird.

Die Messungen wurden im Dialysepuffer UZ2 ausgeführt, der 800mM NaCl enthält, daher ist jede ionische Wechselwirkung, die das Protein eingehen kann, abgesättigt. So kann schon die kleinste hydrophobe Attraktion zu einer Aggregation führen. Eine Verringerung der Salzkonzentration ist jedoch nicht empfehlenswert, da die Zentrifugation bei Raumtemperatur stattfindet, und diese Salzkonzentration für die Stabilität des Enzyms nötig ist. Um jedoch eine valide Messung des Aggregatzustandes von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und ihrer Mutanten mit Affinitätstag zu erhalten, muß durch den Zusatz von Detergenzien die Aggregation herabgesetzt werden. Dabei muß allerdings darauf

geachtet werden, daß zwar die Aggregation, nicht aber die Monomer/Monomer-Interaktion des Enzyms unterdrückt wird. Weiterhin darf das zugesetzte Detergens bei der Meßwellenlänge 230nm keine Absorption aufweisen. Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die getesteten Detergenzien und ihre spektroskopischen Eigenschaften bei 230nm.

Tab. 3.4: Detergenzien für die analytische Ultrazentrifugation

Detergens	Name	Anteil	OD <sub>230nm</sub>
Lubrol	Ethylenoxidkondensate langkettiger Alkohole	0,01%	0,0353
		0,1%	0,0686
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	0,01%	0,0426
		0,1%	0,2329
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat	2%	1,1285

Wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> wurde gegen den Puffer UZ3 dialysiert, der im Gegensatz zu UZ2 kein Magnesiumchlorid enthält. Die Lösung wird mit 0,01% beziehungsweise 0,1% Lubrol oder 0,01% Tween-20 versetzt, einer Zentrifugation unterzogen und ausgewertet. Das Molekulargewicht wurde in jeder der Lösungen zu 180 bis 250kg/mol bestimmt, was einer Anzahl von sechs bis acht Untereinheiten von je 31kg/mol entspricht. Bei der hohen Drehzahl (22000U/min) sedimentieren die schweren Teilchen auf den Boden der Zelle. Bei einer Reduktion der Drehzahl (15000U/min) wurden sie wieder in das Gleichgewicht zurückgeführt. Es kann sich daher nicht um eine irreversible Aggregation handeln, sondern um ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Spezies mit kontinuierlicher Assoziation und Dissoziation. Wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> zeigte in ihrem Verhalten keine Abhängigkeit von den zugesetzten Detergenzien.

Zusatz von Guanidiniumhydrochlorid wurde ebenfalls untersucht (vergleiche 3.2.1.3).

### 3.1.4 Enzymatischer Abbau des Hexahistidintags durch Carboxypeptidase A

Der enzymatische Abbau des Hexahistidintags ist mit Carboxypeptidasen möglich. Es handelt sich dabei um Exopeptidasen, die am C-Terminus eines Proteins Aminosäuren hydrolytisch abspalten. Dabei zeigen verschiedene Carboxypeptidasen unterschiedliche Geschwindigkeiten in der Abspaltung einer definierten Aminosäure. Carboxypeptidase A ist für den Abbau der Histidine des Affinitätstags geeignet, da sie basische Aminosäuren schnell, aber Lysin, das in *EcoRI* als letzte Aminosäure vor dem Affinitätstag steht, nur langsam spaltet. So ist zu erwarten, daß ein spezifischer Abbau möglich ist.

Eingesetzt wurde Carboxypeptidase A (CPA), die an Agarose kovalent gebunden ist. So ist eine quantitative Entfernung dieses Enzyms aus dem Reaktionsansatz durch Zentrifugation möglich. Außerdem bietet sich die Möglichkeit der Verwendung von Säulen, bei denen der Durchlauf idealerweise kein Protein mit Affinitätstag mehr enthält.

Die Reaktionsbedingungen wurden analog zu den Arbeiten von Rotzal (1992) im *EcoRI*-Standardspaltpuffer durchgeführt. Die CPA weist eine Aktivität von  $6 \cdot 10^{-3} \text{U}/\mu\text{l}$  Agarose auf, wobei 1U 1  $\mu\text{mol}$  Substrat bei 30°C umsetzt, so daß eine Verdünnung nötig ist. Dafür wurde Sephadex G-25 verwendet, von dem zuvor getestet wurde, daß es keine Interaktionen mit *EcoRI* eingeht.

Die Reaktion wird zunächst mit 22pmol wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> und CPA-Verdünnungen von 1:1000 und 1:10000 mit Sephadex G-25 für 5min bei 30°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abzentrifugation der matrixgebundenen Carboxypeptidase beendet. Mit dem Überstand der Reaktion wurde eine Kinetik auf  $\lambda$ -DNA ausgeführt (siehe 2.5.10), die verbleibende Lösung auf ein Laemmligel aufgetragen (siehe 2.5.2). Der Test auf die Spaltaktivität der Reaktionslösung diente der Überprüfung, daß die Funktionalität der Restriktionsendonuklease nicht zerstört wurde. Ein Unterschied in der Spaltaktivität durch den Verlust des Affinitätstags ist nicht detektierbar. Allerdings ist gezeigt worden, daß wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ein von wt-*EcoRI* deutlich abweichendes Laufverhalten im Laemmligel-System zeigt [Grabowski, 1993].

Bei dem oben beschriebenen Test zeigten sich keine Unterschiede in der Spaltaktivität der Reaktionslösungen, woraus zu schließen war, daß die Restriktionsendonuklease intakt blieb. Im Laemmligel konnte jedoch kein Laufunterschied zwischen den einzelnen Ansätzen detektiert werden.

Im Folgenden wurden verschiedene Reaktionsbedingungen mit jeweils 4,4pmol wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> getestet:

- CPA-Verdünnungen: 1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10, unverdünnt, Sephadex G-25
- Temperaturen: Raumtemperatur, 30°C, 37°C
- Inkubationszeiten: 5min, 30min

Unter keiner der aufgeführten Bedingungen konnte im Laemmligel ein Unterschied im Laufverhalten detektiert werden, und die Reaktionslösungen unterschieden sich nicht in der Spaltaktivität vor und nach der Inkubation mit CPA.

Um das Fehlen des Hexahistidintags direkt nachzuweisen, wurde für die nachfolgenden Versuche ein anderes Analyseverfahren gewählt: Nach der Inkubation mit CPA wurden die Ansätze mit dem Affinitätsmaterial Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose versetzt, um die Moleküle zu binden, die noch einen Affinitätstag besitzen. Es sollten lediglich diejenigen Moleküle in der Lösung verbleiben, bei denen durch die Reaktion der CPA die Histidine abgebaut wurden. Zugewetzt wurden 3  $\mu\text{l}$  Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, die 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein binden kann. Somit herrscht ein etwa 50facher Überschuß an Bindungs-

plätzen bei einem Reaktionsansatz mit 22pmol *wt-EcoRI*<sub>His6</sub>, so daß die gesamte eingesetzte Proteinmenge gebunden werden kann.

*Wt-EcoRI*<sub>His6</sub> und *wt-EcoRI* wurden mit Sephadex-G25 inkubiert und anschließend mit 3µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose für 30min bei Raumtemperatur versetzt. Nach Zentrifugation konnte im Überstand für *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> nur noch geringe Spaltaktivität festgestellt werden, während *wt-EcoRI* weder durch Sephadex noch durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose in ihrer Spaltaktivität beeinflusst wurde.

Zum Test der Reaktivität der CPA wurden in einer Kinetik je 4,4pmol *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> mit 5µl CPA (unverdünnt oder 1:10 mit Sephadex G-25 verdünnt) bei 30°C inkubiert. Nach 30, 60, 120 und 180min wurde ein Aliquot abgenommen und mit 3µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose versetzt und für weitere 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden während der gesamten Zeitdauer regelmäßig bewegt, um eine Sedimentation der Säulenmaterialien zu verhindern. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose 1:10 verdünnt und in eine Spaltkinetik eingesetzt. Abbildung 3.10 zeigt die Spaltmuster.

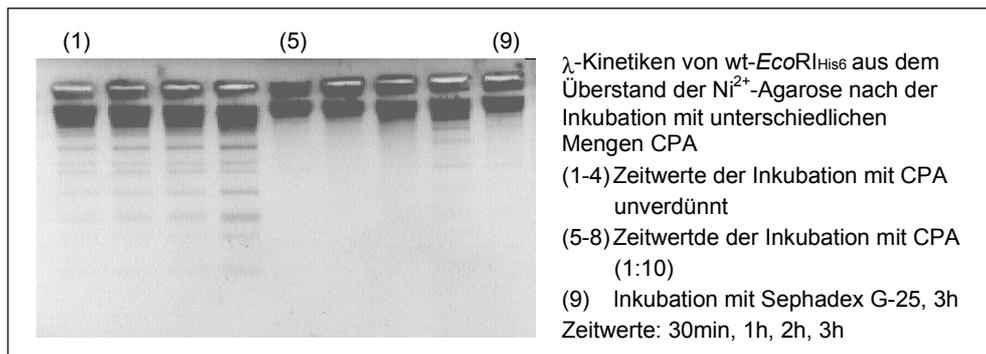


Abb. 3.10: Spaltungen von *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> auf λ-DNA nach Inkubation mit CPA für unterschiedliche Zeiten

In der Referenzlösung ist zu sehen, daß sich *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> nach der Inkubation mit Sephadex G-25 quantitativ aus der Lösung entfernen läßt, da sich keine Spaltaktivität mehr zeigt. Nach der Inkubation mit CPA zeigt sich, daß die Menge an *EcoRI* ohne Affinitätstag in der Lösung mit der Zeit zunimmt, die Gesamtmenge ist jedoch sehr klein, da sich selbst nach Inkubation von 4h bei 37°C kein vollständiges Spaltmuster ergibt. Nimmt man eine spezifische Aktivität von  $4 \cdot 10^6$  U/mg für *EcoRI* an, so ergibt sich eine Konzentration von 16pM in der Reaktionslösung der λ-Kinetik. Damit hat CPA nur bei 0,04% der Gesamtproteinmenge den Affinitätstag abgebaut. Damit scheint die Reaktivität der CPA in keiner Weise der angegebenen Menge zu entsprechen. Bei der Verdünnung der CPA ergibt sich ein analoges Bild.

Im Hinblick auf die Problematiken mit Lösungen, die in hohen Konzentrationen ein Protein mit Hexahistidintag enthalten, ist zu vermuten, daß hier ebenfalls die Zugänglichkeit der Histidine eine entscheidende Rolle für die Reaktivität der CPA spielt. Da der Affinitätstag an der Aggregation beteiligt ist, ist zu vermuten, daß er sich im Inne-

ren der Aggregate befindet, so daß die Carboxypeptidase keinen Zugang zu ihrem Substrat findet.

In einem Langzeittest wurden 22pmol wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> mit CPA (jeweils 10µl 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) in einem Endvolumen von 1000µl versetzt und für eine beziehungsweise fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Protein mit Affinitätstag durch Zugabe von 3µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose aus dem Ansatz entfernt und mit 400µl Elutionspuffer (siehe 2.4.3.1) eluiert. Mit den Lösungen nach der Inkubation mit CPA und den Elutionsfraktionen wurden Kinetiken auf λ-DNA ausgeführt. In keinem der Ansätze zeigte sich eine Spaltaktivität, so daß zu schließen ist, daß das Protein bis zur Funktionslosigkeit degradiert wurde.

Es läßt sich aus den Versuchen schließen, daß die Reaktivität der CPA den Herstellerangaben entspricht, es jedoch mit diesem Verfahren nicht möglich ist, in einer kontrollierten Reaktion nur den Affinitätstag abzuspalten. Außerdem ist eine so hohe Verdünnung der Proteinlösung für eine routinemäßige Entfernung des Affinitätstags nicht geeignet.

Um ein schnelles Verfahren zu entwickeln, mit dem nach der Präparation der Proteine der Affinitätstag wieder abgespalten werden kann, darf das Protein in verdünnter Lösung nur eine geringe Zeitspanne in Kontakt mit der CPA kommen. Dafür bietet sich ein Säulenverfahren an: 1µl CPA wurde mit 1ml Sephadex G-25 versetzt und in eine Säule überführt, die mit *EcoRI* Standard-Spaltpuffer äquilibriert wurde. 22pmol wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> wurden in dem gleichen Puffer frisch verdünnt (1:2000 auf 10ml) und auf die Säule aufgetragen (Tropfgeschwindigkeit 250µl/min). Der Durchlauf wurde nach Einstellen der Salzkonzentration auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule (50µl) aufgetragen, um Protein abzutrennen, das noch einen Affinitätstag trug. Um diese Menge zu bestimmen, wurde das Protein mit 200µl Elutionspuffer (150mM Imidazol, siehe 2.4.3.1) wiedergewonnen. Der Durchlauf durch die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule wurde auf eine Ionenaustauschersäule aufgetragen, um funktionstüchtiges Protein zu binden und wieder zu konzentrieren. Das gebundene Protein wird mit 200µl Elutionspuffer (1M NaCl, siehe 2.4.4) eluiert. Diese Lösung sollte funktionsfähige *EcoRI*-Moleküle ohne Affinitätstag enthalten. Die Eluate der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose und der Phosphozellulose wurden einer λ-Kinetik unterzogen (siehe Abbildung 3.11).

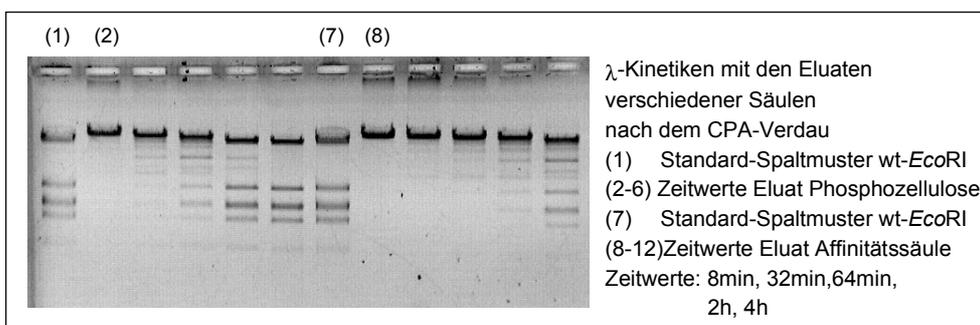


Abb. 3.11: λ-Kinetiken mit den Eluaten von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose und Phosphozellulose nach einer CPA-Säule

Die Spaltaktivität im Eluat der Phosphozellulose ist deutlich höher als die des Eluats der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule. Insgesamt aber ist der Anteil an Protein, der mit Spaltaktivität (ob mit oder ohne Affinitätstag) aus der Reaktion hervorgegangen ist, sehr gering. In analoger Rechnung zu oben ergibt sich eine Ausbeute von 0,2% für *EcoRI* ohne Hexahistidintag.

In der Folge wurden neben *EcoRI*-Standardspaltpuffer der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Äquilibriumspuffer als Reaktionspuffer für CPA getestet, verschiedene Konzentrationen von CPA im Säulenbett, unterschiedliche Verdünnungen für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> (bis 1:20000) und Rezyklisierungsschritte als mögliche Varianten für die Verbesserung der Ausbeuten versucht. Bei keiner der Reaktionsbedingungen war eine nennenswerte Menge der Restriktionsendonuklease ohne Affinitätstag zu gewinnen.

Aufgrund der unpraktikabel hohen Verdünnung der Proteinlösungen (um mindestens 1:2000) und der schlechten Ausbeute, wurde auf weitere Versuche, den Hexahistidintag mit CPA abzubauen, verzichtet.

### 3.1.5 Untersuchungen mit wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>

#### 3.1.5.1 Klonierung und Aufreinigung

Bei der Konstruktion des *ecoRI*-Gens mit dem Hexahistidintag wurde direkt vor dem Tag eine *SpeI*-Schnittstelle integriert [Rotzál, 1992]. Einige Basenpaare nach dem Stopcodon befindet sich eine *PacI*-Schnittstelle, so daß der Affinitätstag in einer Kombinationsspaltung mit beiden Restriktionsendonukleasen aus dem Gen herausgeschnitten werden kann.

Zur Generierung des neuen Affinitätstags wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die nach ihrer Hybridisierung den neuen Affinitätstag ergeben (zur Sequenz siehe Tabelle 2.4). Die einzelsträngigen Bereiche sind dabei kompatibel zu den entstehenden Überhängen des oben genannten Restriktionsverdaus erstellt.

Die positiven Klone unterscheiden sich um 6bp von der Länge des Ausgangsvektors. Mit dem *StrepTag II* wurde eine *AsuI*-Schnittstelle eingeführt, die nur 100bp von einer bereits vorhandenen Schnittstelle im *ecoRI*-Gen entfernt liegt. Das Screening positiver Klone erfolgte auf die Entstehung dieses Fragments. Auf diese Weise wurden zwei positive Klone erhalten. Durch Sequenzierung (siehe 2.3.10) wurde die Sequenz der Klone verifiziert (Sequenz des wt-*ecoRI*<sub>StrepII</sub>-Gens im Anhang (1)).

Nach Transformation von TGE900pEcoR4 (siehe 2.2.4) und Expressionstest (siehe 2.2.5) wurde das Protein in einem 8l-Fermenter exprimiert (siehe 2.4.1) und anschließend über eine *StrepTactin*-Affinitätssäule (siehe 2.4.3.2 und 3.1.6.1) aufgereinigt. Zur stabilen Lagerung der Proteinlösung wurde gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5). Die erhaltene Lösung von wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> hatte eine Reinheit von mindestens 95% in einer Konzentration von 5,5µM.

Die Identität des Enzyms wurde durch *Western blot* überprüft (siehe 2.5.4). Dabei wurde sowohl ein antikörperspezifischer Nachweis für den *StrepTag II* (*StrepTactin-HRP*-Konjugat) als auch für *EcoRI* (polyklonaler Antikörper gegen wt-*EcoRI* vom Kaninchen, zweiter Antikörper *Goat-Anti-Rabbit IgG* gekoppelt mit *HRP*) geführt.

### 3.1.5.2 Charakterisierung von wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>

Die Charakterisierung von wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> erfolgte zunächst auf  $\lambda$ -DNA zur Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität (siehe 2.5.10). Die DNA-Bindungsfähigkeit wurde mit einem Gelretardations-Assay ermittelt. Tabelle 3.5 faßt die Ergebnisse zusammen. Die Werte in Klammern geben die Konzentrationen im Test an.

Tab. 3.5: Spezifische Spaltaktivitäten und Bindungskonstanten des wt-Enzyms mit und ohne Affinitätstag

Protein	spezifische Spaltaktivität [U/mg]	spez. Bindungskonstante [ $M^{-1}$ ]
wt- <i>EcoRI</i>	$5,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^8$
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	$2,7 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^8$
wt- <i>EcoRI</i> <sub>StrepII</sub>	$3,7 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^8$

In diesen Testverfahren ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem wt-Protein und den Varianten mit Affinitätstag. Neben den Standard-Spaltbedingungen wurden *Star*-Bedingungen unter Manganzusatz und unter Niedrigsalz bei pH8,8 getestet (siehe 2.5.10). Bei gleicher Konzentration von *EcoRI* zeigten sich keine Unterschiede in den Spaltaktivitäten oder dem Verlauf der Spaltungen zum Endmuster.

Zur Ermittlung der Strukturdaten wurden beide fusionierten wt-Enzyme einer CD-Spektroskopie unterzogen (siehe 2.5.5). Tabelle 3.6 stellt die ermittelten Strukturen der wt-Enzyme gegenüber.

Tab. 3.6: Strukturelemente aus den CD-Spektren für wt-*EcoRI* mit und ohne Affinitätstag

Enzym	Konz. [ $\mu M$ ]	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	Coil [%]
wt- <i>EcoRI</i>	14,8	40	19	41
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	4,4	35	16	49
wt- <i>EcoRI</i> <sub>StrepII</sub>	5,5	35	10	55

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Strukturen, die sich mit dieser Meßmethode ermitteln lassen.

### 3.1.6 Untersuchungen mit L158D<sub>StreptII</sub>

In den Untersuchungen mit der Mutante L158D<sub>His6</sub> wurde festgestellt, daß der Affinitätstag eine Aggregation des Enzyms bewirkt, die eine Untersuchung des monomeren Zustandes der Mutante L158D<sub>His6</sub> erschwert. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Affinitätstag, der *StrepTag II*, eingeführt und einige der Untersuchungen mit diesem Protein wiederholt.

#### 3.1.6.1 Klonierung und Aufreinigung der Mutante L158D<sub>StreptII</sub>

Aus dem Plasmid pR1Strep mit dem *wt-ecoRI<sub>StreptII</sub>*-Gen und pRIF309+, welches das Gen für L158D<sub>His6</sub> enthält, wurde durch Restriktionsspaltung (siehe 2.3.2) und Ligation (siehe 2.3.3) das Gen für L158D<sub>StreptII</sub> erstellt. Mit der DNA eines positiven Klones wurden TGE900pEcoR4 transformiert (siehe 2.2.4) und ein Expressionstest (siehe 2.2.5) durchgeführt. Mit einem expressionspositiven Klon erfolgte die Produktion des Proteins im 500ml-Maßstab.

Die Aufreinigung von L158D<sub>StreptII</sub> erfolgte über eine *StrepTactin*-Affinitätssäule (siehe 2.4.3.2). Abbildung 3.12 zeigt den Verlauf der Aufreinigung durch das Affinitätsmaterial *StrepTactin* und das Elutionsprofil durch Desthiobiotin (DTB).

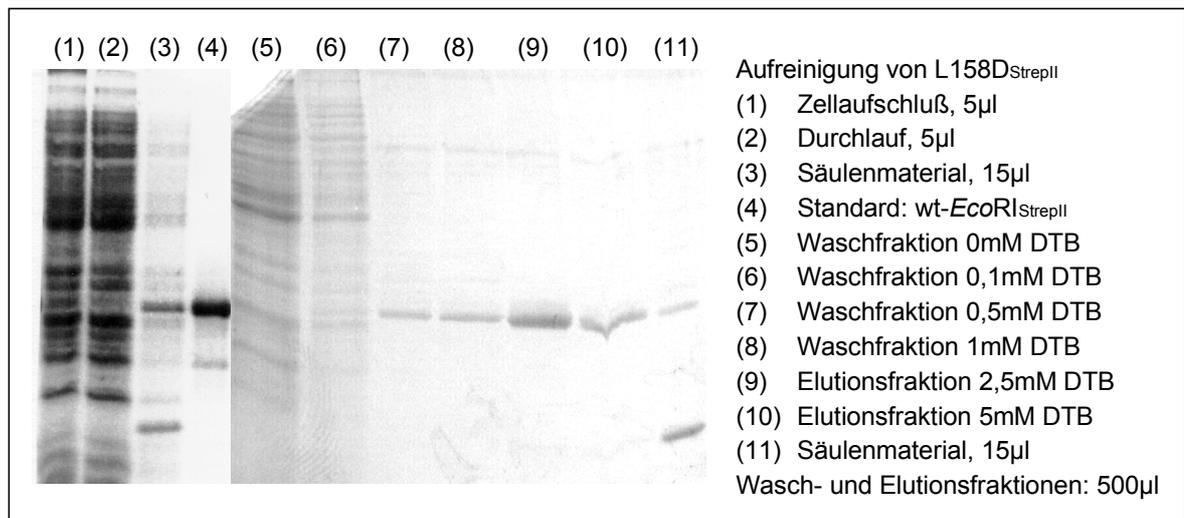


Abb. 3.12: Aufreinigung der Mutante L158D<sub>StreptII</sub>

Das klare Zellysat nach dem Ultraschallaufschluß wurde zweifach über das Säulenmaterial gegeben. Der Durchlauf enthält keine sichtbare Bande im Bereich der *EcoRI* mehr. Neben der Bande in Höhe des *EcoRI*-Standards ist deutlich die Bande für das *StrepTactin* zu sehen, an das der *StrepTag II* bindet (vergleiche auch Bahn 11). In den folgenden Waschschrritten werden alle Proteine außer der *EcoRI* von der Säule entfernt. Schon bei einem Zusatz von 0,1mM Desthiobiotin ist eine leichte Bande auf der Höhe des Zielproteins zu sehen. Der Waschschrtritt mit 0,5mM Desthiobiotin enthält schon L158D<sub>StreptII</sub> zu einem überwiegenden Anteil, ebenso wie die

Waschfraktion mit 1mM Desthiobiotin. Die Elution erfolgt mit 2,5mM beziehungsweise 5mM Desthiobiotin und resultiert in sauberem Protein (>95%). Das Säulenmaterial nach der Elution zeigt allerdings, daß noch immer Protein gebunden ist. Die Waschschrirte mit hohem Anteil Desthiobiotin wurden bei anschließenden Aufreinigungen nicht mehr ausgeführt.

Im Vergleich zur Aufreinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen (siehe zum Beispiel Grabowski *et al.*, 1995) ist die Bindung der *StrepTag II*-Fusionsproteine an die Matrix weniger fest, doch ergibt sich aus der höheren Selektivität eine verbesserte Anreinigung aus einem Zellysat. Durch Einsatz des *Batch*-Verfahrens und Reduktion der Waschschrirte ergibt sich eine schnelle und effiziente Aufreinigung.

Die Regeneration des *StrepTactins* ist nach Herstellerangaben möglich, resultierte jedoch bei wiederholtem Einsatz der Matrix zu einer Absorption der eluierten Proteinlösung bei 260nm und verhinderte so eine UV-spektroskopische Bestimmung des Proteingehalts. Die Wiederverwendung des Säulenmaterials kann daher nicht empfohlen werden.

L158D<sub>StrepII</sub> wurde nach der Elution gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5). Die Konzentration wurde durch UV-Spektroskopie (siehe 2.5.1) zu 1,1µM ermittelt.

### 3.1.6.2 Charakterisierung von L158D<sub>StrepII</sub>

Zum Vergleich der Spalteigenschaften der Mutanten L158D<sub>His6</sub> und L158D<sub>StrepII</sub> wurden beide Enzyme bei 37°C oder 16°C auf dem Substrat λ-DNA getestet (siehe 2.5.10). Abbildung 3.13 stellt die Ergebnisse gegenüber.

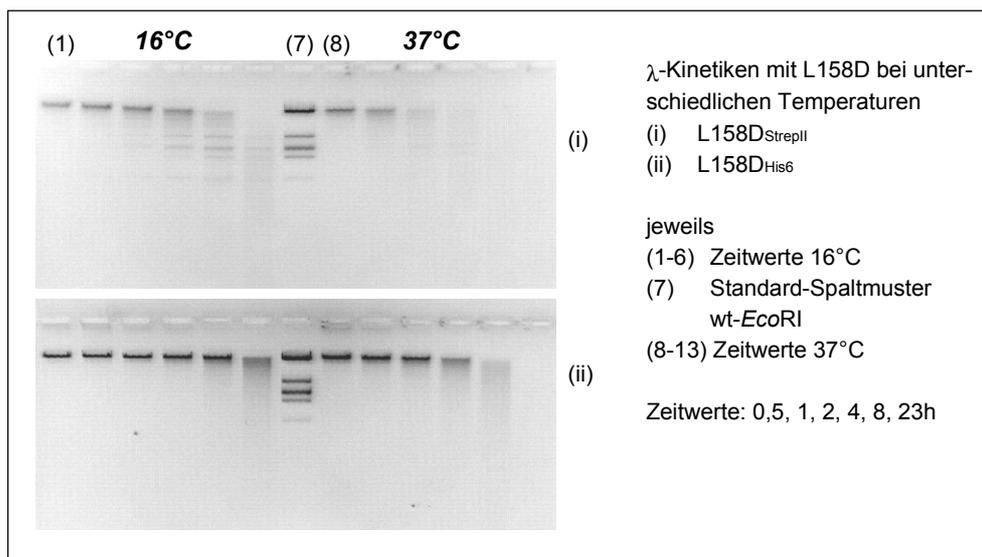


Abb. 3.13: λ-Kinetiken mit L158D<sub>His6</sub> und L158D<sub>StrepII</sub> bei 16°C und 37°C

L158D<sub>StreptII</sub> zeigt im Gegensatz zur Proteinvariante mit Hexahistidintag ein Spaltmuster bei 16°C. Bis zum Zeitpunkt von 4h nimmt das Bandenmuster der spezifischen Spaltung zu, so daß davon ausgegangen werden muß, daß noch aktive Dimere in der Lösung existieren. Neben der spezifischen Spaltung ist auch deutlich eine Nukleaseaktivität zu sehen, die ab 2h eine deutliche Verschmierung der Banden bewirkt. Im Vergleich zu L158D<sub>His6</sub> ist der Abbau der DNA beim letzten Zeitwert (23h in (i) und (ii)) weiter fortgeschritten. Analoges Verhalten der Mutanten ergibt sich bei 37°C: Hier ist der unspezifische Abbau von DNA durch L158D<sub>StreptII</sub> weiter fortgeschritten als bei L158D<sub>His6</sub>.

Insgesamt scheint die Mutanten L158D<sub>StreptII</sub> eine etwas höhere Aktivität aufzuweisen.

In Analogie zu den anderen Mutanten an der Position 158 (siehe 3.1.2) wurde die Bestimmung der spezifischen Bindungskonstante bei 16°C und bei Raumtemperatur ausgeführt. Bei keiner der Temperaturen konnte eine Bindungskonstante ermittelt werden.

Eine Analyse der Strukturanteile durch CD-Spektroskopie war aufgrund der geringen Proteinkonzentration nicht möglich.

### 3.1.7 Gelfiltration mit *StrepTag II*-Fusionsproteinen

In der Gelfiltration findet eine Trennung der Proteinanteile nach ihrem Molekulargewicht statt. Daher ist sie geeignet, den Oligomerisierungszustand eines Proteins zu ermitteln. Durch die Messung von BSA (68kDa) und Lysozym (14,4kDa) im gleichen Puffer ist eine Zuordnung der *Peaks* zu monomeren und dimeren Strukturen von *EcoRI* möglich.

Der Puffer enthält 800mM NaCl, so daß hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinteilen begünstigt werden. *EcoRI* wird auf dem Säulenmaterial (Superose) retardiert, so daß die Banden zu kleineren Molekulargewichten verschoben sind.

Abbildung 3.14 stellt die Gelfiltrationen von wt-*EcoRI*, wt-*EcoRI*<sub>StreptII</sub> und L158D<sub>StreptII</sub> gegenüber.

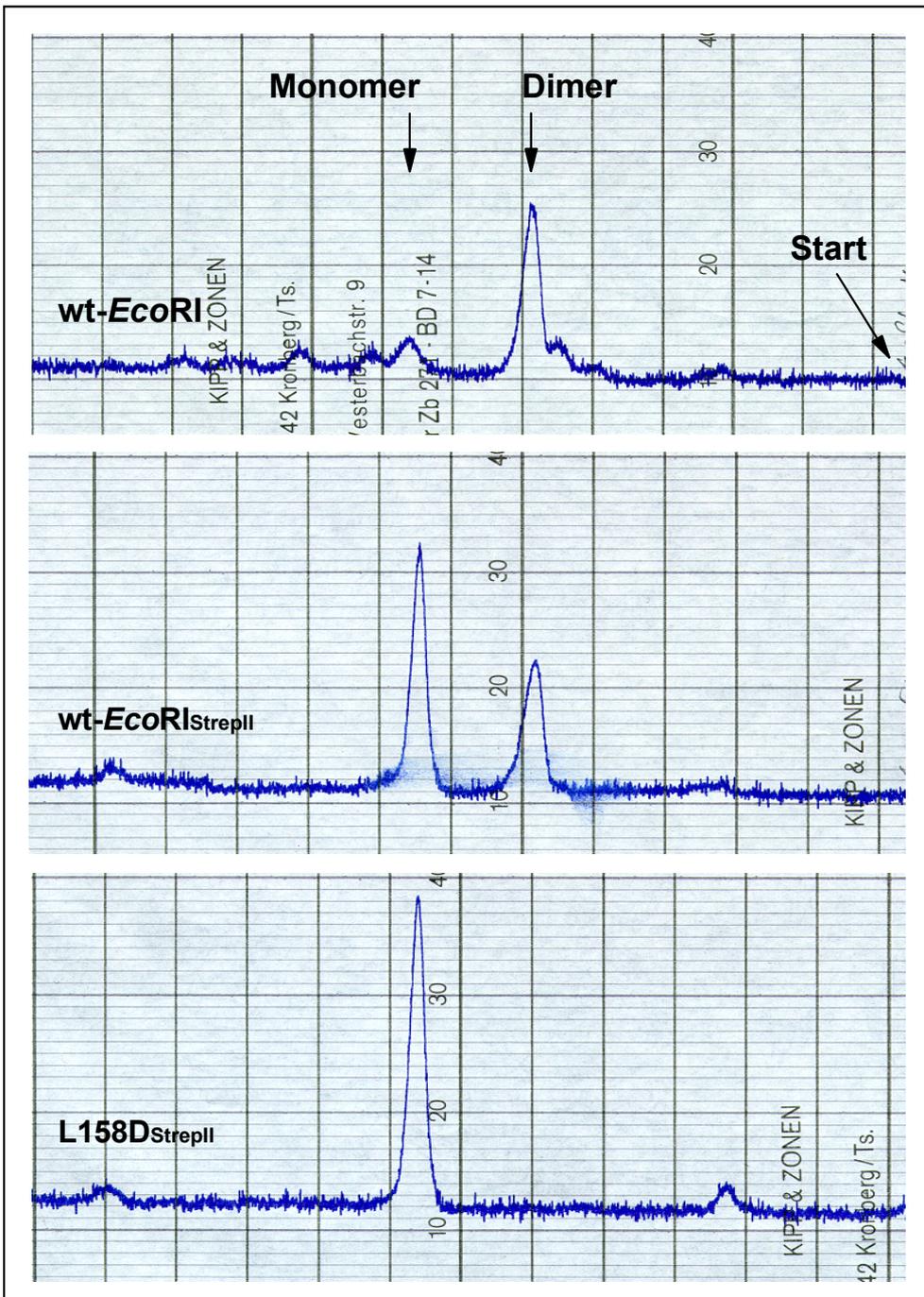


Abb. 3.14: Gelfiltrationen von wt-*EcoRI*, wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> und L158D<sub>StrepII</sub>

Für wt-*EcoRI* werden erwartungsgemäß zwei Banden ermittelt, die Monomer und Dimer zugeordnet werden. Für wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> ergibt sich das gleiche Bild, doch ist hier das Verhältnis der Proteinanteile verschoben, die Präparation zeigt in der Gelfiltration wesentlich mehr Monomer als wt-*EcoRI*. Dies könnte auf das Aufreinigungsverfahren des Enzyms zurückzuführen sein, da die Präparation aufgrund der guten Aufreinigung durch den *StrepTag II* keiner Phosphozellulosesäule unterzogen wurde, die für eine weitere Aufreinigung des Enzyms verwendet wird.

Für die Mutante L158D<sub>StrepII</sub> ist unter diesen Bedingungen nur monomeres Protein zu detektieren.

## 3.2 Heterodimerisierung von *EcoRI*

Jede Mutation, die in ein homodimeres Enzym auf DNA-Ebene eingeführt wird, resultiert in einer Änderung beider Untereinheiten, so daß die Symmetrie des Proteins erhalten bleibt. Zur Untersuchung der Auswirkungen von Änderungen in nur einer Untereinheit ist die Konstruktion eines heterodimeren Enzyms nötig, das sich in den Eigenschaften der Untereinheiten unterscheidet. Auf diese Weise kann das Zusammenspiel der Proteinhälften (zum Beispiel in der Kopplung der DNA-Bindung an die Katalyse) untersucht werden.

Proteine mit der Mutation L158D erwiesen sich als fähig, mit der Mutante I230K<sub>His6</sub> Heterodimere zu bilden, die größere Stabilität als die Homodimere aufwiesen [Vennekohl, 1996]. Sie sind jedoch nicht ausreichend stabil, um eine Charakterisierung zu erlauben.

Durch die Einführung von Cysteinen ist es möglich, Heterodimere durch ein *Cross link*-Reagenz kovalent zu verknüpfen, um eine Dissoziation einmal gebildeter Heterodimere zu verhindern. Allerdings ist die Austauschrate von Untereinheiten in Enzymen mit intakter Interaktionsfläche sehr gering [Jeltsch, 1994], so daß eine Kombination mit den Mutationen L158D und I230K sinnvoll erscheint.

Eine andere Möglichkeit ist die Koexpression verschiedener Untereinheiten, bei der Hetero- und Homodimere gleichermaßen entstehen.

Bei allen Verfahren ist jedoch die Abtrennung der heterodimeren Enzyme von den Homodimeren entscheidend, um eine Charakterisierung des heterodimeren Proteins zu ermöglichen.

### 3.2.1 Erzeugung von Heterodimeren durch *Cross link*-Experimente

Eine Möglichkeit zur kovalenten Verknüpfung von Aminosäureseitenketten bieten *Cross link*-Reagenzien, die sich durch zwei reaktive Gruppen auszeichnen. Eine spezifische Verknüpfung von Thiolgruppen ist durch Bismaleimidohexan (BMH) möglich, dessen reaktive Gruppen (Maleimide) mit den SH-Gruppen reagieren können.

*EcoRI* besitzt nur ein Cystein in der Aminosäuresequenz (Position 218). Es befindet sich im Innern des Enzyms und ist nicht frei zugänglich. Damit ist das wt-Enzym vor einer Reaktion mit dem BMH geschützt (siehe Abbildung 3.15).

Um eine kovalente Verknüpfung der Untereinheiten von *EcoRI* zu erreichen, müssen die betreffenden Aminosäuren beiden Untereinheiten angehören. BMH besitzt eine *Spacer*-Länge von 16,1Å (vergleiche auch Abbildung 2.2), so daß sich die Reste der Aminosäuren sehr nahe kommen müssen, um eine Verknüpfung zu erlauben. Außerdem müssen sie auf der Oberfläche des Enzyms lokalisiert sein. Abbildung 3.15

zeigt eine Ansicht auf die Dimerisierungsfläche von *EcoRI*. Aminosäuren, auf die diese Bedingungen zutreffen, sind hervorgehoben. In der rechten oberen Ecke der Abbildung ist die Oberfläche des Enzyms in der gleichen Ansicht dargestellt, um die Lokalisation der Aminosäuren an der Interaktionsfläche des Enzyms zu verdeutlichen.

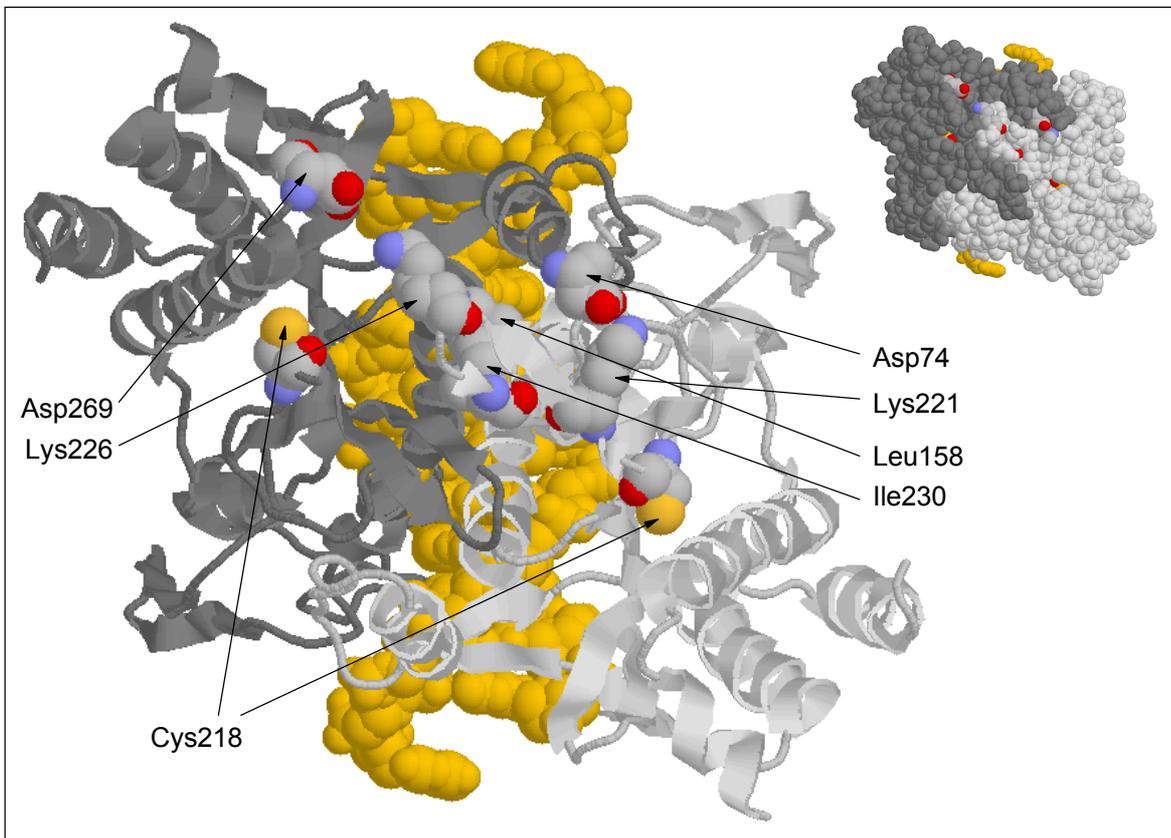


Abb. 3.15: Lokalisation der zu verändernden Aminosäuren auf der Oberfläche von *EcoRI*

Bei den dargestellten Aminosäureresten handelt es sich um folgende Paare: Asp74 steht Lys221 gegenüber (Abstand der  $\alpha$ -C-Atome in der Kristallstruktur: 10,1Å) sowie Lys226 mit Asp269 (Abstand der  $\alpha$ -C-Atome: 14,2Å). Zusätzlich zu den Cysteinen wurden die Lysin-Reste zu Aspartat mutiert und umgekehrt, um die Bedeutung der potentiellen Salzbrücken für die Stabilität des Enzyms zu ermitteln.

Ein weiteres mögliches Paar für eine *Cross link*-Reaktion stellen die Aminosäuren Leu158 und Ile230 dar (Abstand der  $\alpha$ -C-Atome: 8,76Å). Sie befinden sich im Innern des Enzyms in der hydrophoben Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten. Bei diesem Paar wurde ebenfalls die Doppelmutante L158C-I230C hergestellt.

### 3.2.1.1 Erzeugung und Charakterisierung der Stabilitätsmutanten

Die Mutanten der oben genannten Positionen wurden mittels *Gapped duplex*-Mutagenese (Mutageneseprimer und Durchführung siehe 2.3.7) als Fusionsproteine mit dem Hexahistidintag hergestellt und ihre Basensequenz durch Sequenzierung verifi-

ziert (siehe 2.3.10). Die Proteine wurden in TGE900pEcoR4 überexprimiert (siehe 2.4.1) und affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 2.4.3.1). Zur stabilen Lagerung wurden die Proteinlösungen gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5). Tabelle 3.7 zeigt die Konzentrationen und Reinheitsgrade der Mutanten gemeinsam mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie.

Tab. 3.7: Konzentration, Reinheitsgrad und Sekundärstrukturanteile der Stabilitätsmutanten

Protein	Konz. [µM]	Reinheit	α-Helix [%]	β-Faltblatt [%]	Coil [%]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	4,4	>95%	35	16	49
D74K <sub>His6</sub>	1,4	>95%	42	12	46
K221D <sub>His6</sub>	1,4	>95%	41	9	50
K226D <sub>His6</sub>	3,5	>95%	36	18	47
D269K <sub>His6</sub>	3,0	≈25%	/	/	/

Für die Proteinvariante D269K<sub>His6</sub> konnte keine zufriedenstellende Aufreinigung durch die Affinitätschromatographie erreicht werden, obwohl während der Aufarbeitung zahlreiche Bedingungen variiert wurden (zum Beispiel Salzkonzentration und pH-Wert).

Die Sekundärstrukturanteile der Mutanten sind nach der Anpassung mit den Daten für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> konsistent. Bei der Mutante D269K<sub>His6</sub> war eine Messung des Spektrums bei einer Sauberkeit der Mutante von nur etwa 25% nicht möglich.

Die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität wurde mit λ-DNA unter verschiedenen Pufferbedingungen ausgeführt (siehe 2.5.10), die Ergebnisse für den Standard-Spaltpuffer sind in Tabelle 3.8 dargestellt. Die Werte in Klammern geben die Konzentration des Enzyms im Test an. Die DNA-Bindungskonstante wurde bei Raumtemperatur mit einem Gelretardations-Assay (siehe 2.5.9) ermittelt (siehe Tabelle 3.8).

Tab. 3.8: Spezifische Spaltaktivitäten und Bindungskonstanten der Stabilitätsmutanten

Protein	spezifische Spaltaktivität [U/mg]	spez. Bindungskonstante [M <sup>-1</sup> ]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	3,7·10 <sup>6</sup> (0,3nM)	4,5·10 <sup>8</sup>
D74K <sub>His6</sub>	2,3·10 <sup>6</sup> (1,8nM)	8,3·10 <sup>7</sup>
K221D <sub>His6</sub>	8,8·10 <sup>5</sup> (4,6nM)	1,7·10 <sup>7</sup>
K226D <sub>His6</sub>	2,8·10 <sup>6</sup> (1,2nM)	4,9·10 <sup>8</sup>
D269K <sub>His6</sub>	5,2·10 <sup>5</sup> (3,3nM)	3,0·10 <sup>6</sup>

Alle eingeführten Mutationen befinden sich in großer Entfernung vom katalytischen Zentrum, so daß eine Beeinflussung der DNA-Spalt- und -Bindungseigenschaften nicht wahrscheinlich ist. Die Umkehr der ladungstragenden Aminosäuren der Salzbrücken auf der Oberfläche des Enzyms haben keine nachteilige Wirkung auf die Stabilität der Mutanten, da diese nach wie vor spezifische Spaltaktivitäten zeigen, die um weniger als den Faktor zehn von der Aktivität des wt-Enzyms abweichen. Die Mutanten zeigen eine äquivalent gute DNA-Bindungskonstante.

Die Spaltungen unter *Star*-Bedingungen wiesen unter alkalischen Bedingungen mit niedriger Salzkonzentration keine signifikanten Unterschiede zum wt-Enzym auf.

### 3.2.1.2 Erzeugung und Charakterisierung der Cystein-Einzelmutanten

Die Mutanten der oben genannten Positionen wurden mittels *Gapped duplex*-Mutagenese (Mutageneseprimer und Durchführung siehe 2.3.7) als Fusionsproteine mit Hexahistidintag hergestellt und ihre Basensequenz durch Sequenzierung verifiziert (siehe 2.3.10). Nach Überexpression in TGE900pEcoR4 (siehe 2.4.1) wurden sie affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 2.4.3.1) und anschließend zur stabilen Lagerung gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5).

Tabelle 3.9 zeigt die Konzentrationen und Reinheitsgrade der Mutanten gemeinsam mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie.

Tab. 3.9: Konzentration, Reinheitsgrad und Sekundärstrukturanteile Cystein-Einzelmutanten

Protein	Konz. [µM]	Reinheit	α-Helix [%]	β-Faltblatt [%]	Coil [%]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	4,4	>95%	35	16	49
K221C <sub>His6</sub>	1,2	>95%	34	17	49
K226C <sub>His6</sub>	4,8	>95%	36	17	47
D269C <sub>His6</sub>	1,7	>95%	35	15	50
L158C <sub>His6</sub>	4,0	≈80%	37	20	43
I230C <sub>His6</sub>	10,7	>95%	34	18	48
L158C-I230C <sub>His6</sub>	4,8	>95%	36	18	47

Die Mutante D74C<sub>His6</sub> wurde zwar in der Mutagenese erhalten, die Expression erfolgte jedoch nur in sehr geringem Ausmaß, und das Protein befand sich nach dem Zellaufschluß und anschließender Zentrifugation im Sediment. Bei Aufschluß der Zellen in einem Puffer mit höherer Salzkonzentration (PDL, 1M NaCl) konnte ein Teil des Proteins in Lösung gehalten werden. Es war jedoch keine Anreicherung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose möglich, die eine ausreichende Menge Protein für die Unter-

suchungen geliefert hätte. In einem Test der Spaltaktivität aus einem Rohaufschluß (siehe 2.2.5) konnte die spezifische Aktivität der Mutante nachgewiesen, jedoch nicht bestimmt werden.

Die Sekundärstrukturanteile der Mutanten sind nach der Anpassung CD-Spektren mit denen für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> konsistent. Für Mutanten geringerer Konzentration (<1,5µM) waren die Spektren nicht mehr sicher auswertbar, sie widersprechen jedoch nicht der wt-Struktur.

Die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität wurde mit λ-DNA unter verschiedenen Pufferbedingungen ausgeführt (siehe 2.5.10). Die Ergebnisse für den Standard-Spaltpuffer sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Die Werte in Klammern geben die Konzentration des Enzyms im Test an. Die spezifische DNA-Bindungskonstante wurde bei Raumtemperatur mit einem Gelretardations-Assay (siehe 2.5.9) ermittelt (siehe Tabelle 3.10).

Tab. 3.10: Spezifische Spaltaktivitäten und Bindungskonstanten der Cystein-Einzelmutanten

Protein	spezifische Spaltaktivität [U/mg]	spez. Bindungskonstante [M <sup>-1</sup> ]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	3,7·10 <sup>6</sup> (0,3nM)	4,5·10 <sup>8</sup>
K221C <sub>His6</sub>	4,9·10 <sup>6</sup> (0,8nM)	1,7·10 <sup>9</sup>
K226C <sub>His6</sub>	2,0·10 <sup>6</sup> (1,6nM)	1,7·10 <sup>8</sup>
D269C <sub>His6</sub>	5,6·10 <sup>6</sup> (0,6nM)	1,3·10 <sup>9</sup>
L158C <sub>His6</sub>	2,1·10 <sup>6</sup> (1,9nM)	5,0·10 <sup>7</sup>
I230C <sub>His6</sub>	7,5·10 <sup>4</sup> (7,1nM)	6,3·10 <sup>8</sup>
L158C-I230C <sub>His6</sub>	3,2·10 <sup>5</sup> (6,4nM)	7,0·10 <sup>7</sup>

Analog zu den unter 3.2.1.1 beschriebenen Mutanten ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede für spezifische Bindung und Spaltaktivität. Nur bei der Mutante I230C<sub>His6</sub> ergab sich hier eine Diskrepanz, da sie eine sehr gute DNA-Bindung, aber nur eine spezifische Aktivität von 7,5·10<sup>4</sup> U/mg aufweist.

### 3.2.1.3 Cross link-Experimente mit Cystein-Einzelmutanten

Durch die Einführung von Cysteinen ist eine spezifische Kopplungsreaktion zweier Seitenketten mit einem entsprechenden *Cross link*-Reagenz möglich. Bismaleimidohexan (BMH, *Spacer*-Länge 16,1Å) reagiert spezifisch mit Thiolgruppen-Gruppen eines Proteins. Wenn sich die mutierten Aminosäuren in unterschiedlichen Untereinheiten befinden (vergleiche Abbildung 3.15), können so kovalent verknüpfte Proteine

erhöhten Molekulargewichts erzeugt werden, die auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) detektierbar sind.

In einer Mischung aus *EcoRI*-Mutanten sind neben den möglichen Heterodimeren auch immer Homodimere vorhanden, da es sich bei dem Austausch von Untereinheiten um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. Daher ist nicht nur der Abstand der Cysteine im Heterodimer von Bedeutung, sondern auch derjenige im Homodimer.

Von der Mutante D74C konnte kein Protein gewonnen werden, so daß das Heterodimerpaar D74C/K221C nicht untersucht werden konnte.

Nach Dialyse gegen BMH-Reaktionspuffer wurde die Funktionalität der Enzyme durch die Analyse der spezifischen Spaltaktivität auf  $\lambda$ -DNA (siehe 2.5.10) verifiziert. Die Konzentrationen von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>, I230C<sub>His6</sub>, L158C<sub>His6</sub>, L158C-I230C<sub>His6</sub> und K226C<sub>His6</sub> wurden mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 1,5 $\mu$ M eingestellt. Die *Cross link*-Reaktionen wurden äquimolar oder mit dreifachem molaren Überschuß BMH ausgeführt. Für die Mutante D269C<sub>His6</sub> ergab sich nach der Dialyse eine Konzentration von 0,5 $\mu$ M, so daß das *Cross link*-Reagenz in drei- bis neunfachem Überschuß eingesetzt wurde. Die Inkubationszeiten betragen jeweils 30min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Heterodimerlösungen wurden aus den Einzelmutanten L158C<sub>His6</sub> und I230C<sub>His6</sub> (ergibt L158C<sub>His6</sub>/I230C<sub>His6</sub>) beziehungsweise K226C<sub>His6</sub> und D269C<sub>His6</sub> (ergibt K226C<sub>His6</sub>/D269C<sub>His6</sub>) durch Mischen äquimolarer Mengen hergestellt. Die Lösungen wurden zusammen mit den oben angegebenen Mengen *Cross link*-Reagenz über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein weiterer Ansatz wurde ohne *Cross link*-Reagenz inkubiert, anschließend mit einem Überschuß BMH versetzt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Reaktionen wurden nach den angegebenen Zeiten durch die Zugabe eines Überschusses 1,4-Dithiothreitol gestoppt und auf einem Laemmligel (siehe 2.5.2) analysiert (siehe Abbildung 3.16).

Tabelle 3.11 stellt die Entfernungen der  $\alpha$ -C-Atome in Homo- und Heterodimerpaaren und die damit verbundene erwartete Anzahl von *Cross link*-Banden innerhalb eines Proteins den im Experiment gefundenen Banden gegenüber.

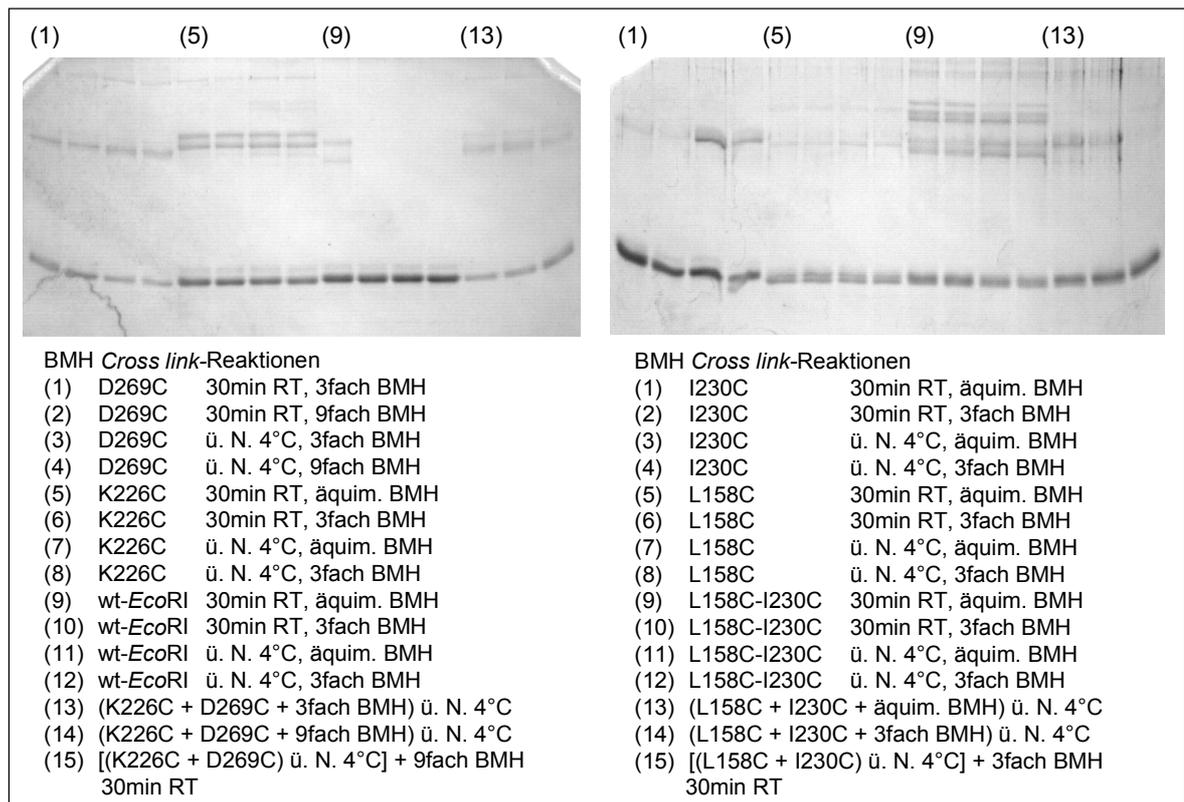


Abb. 3.16: Cross link-Reaktionen mit BMH; Alle Enzyme wurden als Hexahistidin-Fusionsprotein eingesetzt.

Tab. 3.11: Erwartete und erhaltene Cross link-Banden mit BMH; A und B bezeichnen die beiden Unter-einheiten; Alle Enzyme wurden als Hexahistidin-Fusionsproteine eingesetzt.

Protein	$\alpha$ -C-Atome	Abstand [Å]	Cross link erwartet	Cross link erhalten
wt-EcoRI Homodimer	Cys218 im Innern	nicht zugänglich	keine Bande	(1Bande)
L158C Homodimer	158C (A) zu 158C (B)	16,8	1 Bande	1 Bande
I230C Homodimer	230C (A) zu 230C (B)	4,3	1 Bande	1 Bande
L158C-I230C Homodimer	158C (A) zu 158C (B) 230C (A) zu 230C (B) 158C(A) zu 230C(A)	16,8 4,3 11,3	3 Banden	mind. 4 Banden
L158C/I230C Heterodimer	158C (A) zu 230C (B)	8,8	4 Banden	1 Bande
K226C Homodimer	226C (A) zu 226C (B)	19,6	keine Bande	1 Bande
D269C Homodimer	269C (A) zu 269C (B)	44,1	keine Bande	2 Banden
K226C/D269C Heterodimer	226C (A) zu 269C (B)	14,2	1 Bande	1 Bande

Die *Cross link*-Reaktionen mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ergaben nur unter einer Testbedingung eine Bande im Molekulargewichtsbereich größer 31kDa. Da dies für die anderen Bedingungen und auch in folgenden Versuchen nicht reproduziert werden konnte, ist diese Bande als Artefakt anzusehen.

Die Anzahl der Banden entspricht bei den Mutanten I230C<sub>His6</sub> und L158C<sub>His6</sub> den Erwartungen. Die Doppelmutante L158C-I230C<sub>His6</sub> dagegen weist deutlich mehr Banden auf, als im Vergleich der Positionen der Cysteine möglich sein sollten. Sie liegen in einem molekularen Bereich, in dem keine der anderen Mutanten eine Bande zeigt. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Verknüpfung zu höheren Aggregaten, da in dieser Mutante mehrere Cysteine vorliegen. Im Ansatz zur Erzeugung des Heterodimers L158C<sub>His6</sub>/I230C<sub>His6</sub> erscheint eine Bande, die auf gleicher Höhe mit einer der Banden im *Cross link* der Mutante I230C<sub>His6</sub> läuft. Da die Lösung auch Homodimere der Mutante I230C<sub>His6</sub> enthält, ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um einen *Cross link* dieser Position handelt. Es ist daher zu schließen, daß nur wenig Heterodimer gebildet wurde.

Die Mutante D269C<sub>His6</sub> zeigt eine Bande nach der *Cross link*-Reaktion, obwohl die beiden  $\alpha$ -C-Atome zu weit auseinander stehen, um durch BMH verknüpft zu werden. Eine analoge Situation ergibt sich bei der Mutanten K226C<sub>His6</sub>, hier sind zwei Banden zu erkennen. Im Vergleich zwischen beiden Mutanten ist deutlich zu sehen, daß sich die Banden in ihrem Laufverhalten unterscheiden.

Die Abstände der  $\alpha$ -C-Atome wurden aus dem Enzym-DNA-Kokristall ermittelt. Es muß allerdings davon ausgegangen werden, daß die Enzyme in freier Lösung ohne DNA eine größere Flexibilität aufweisen, und die Abstände der Aminosäureseitenketten somit einer Variation unterliegen (zur Ausführung der *Cross link*-Reaktionen in Gegenwart von DNA siehe unten).

Bei der Mischung zum Heterodimer K226C<sub>His6</sub>/D269C<sub>His6</sub> ergibt sich nur eine Bande, die mit der Bande des Homodimers D269C<sub>His6</sub> parallel läuft.

Die vier Testbedingungen des *Cross link*-Reaktionen ergeben keinen Unterschied in der Anzahl der Banden oder der verknüpften Proteinmenge. Nur bei der Mutante I230C<sub>His6</sub> ergibt sich mit der äquimolaren Menge BMH bei der Inkubation über Nacht eine etwas stärkere Bande als beim Überschuß des *Cross link*-Reagenz.

Zur Überprüfung der Geschwindigkeit der *Cross link*-Reaktion wird in einem wie oben beschriebenen Ansatz mit der dreifachen Menge BMH im Vergleich zum Enzym die Reaktion nach 30, 60, 120 und 240min Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Auf dem Laemmigel war jedoch keine Zunahme der *Cross link*-Banden mit der Zeit zu erkennen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß schon zu Beginn der Reaktion das *Cross link*-Reagenz unbrauchbar ist, wurde zu einem Ansatz mit wt-*EcoRI* und den Mutanten K226C<sub>His6</sub> und D269C<sub>His6</sub> nach definierten Zeiten (15 und 30min) ein Aliquot der

Reaktionslösung entnommen und dem Rest weiteres BMH zugesetzt. Die letzte Reaktion wurde bei 50min gestoppt. Auf dem Laemmligel war jedoch keine Zunahme der *Cross link*-Banden zu verzeichnen. Ein analoger Ansatz mit den Heterodimergemischen führte zum gleichen negativen Ergebnis.

Theoretisch sollte eine äquimolare Menge BMH ausreichen, um eine Mutante in den verknüpften Zustand zu überführen. Die Tatsache, daß durch zusätzliches BMH nicht mehr *Cross link*-Produkt erzeugt wurde, spricht dafür, daß bereits mit der ersten Zugabe des *Cross link*-Reagenzes alle zugänglichen Cysteingruppen verknüpft wurden. Durch die große Menge an Reagenz ist es möglich, jedes Cystein mit einem *Linker* zu belegen, ohne eine Verknüpfung mit einem anderen Molekülteil zu erreichen.

In einem Reaktionsansatz mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>, den Mutanten K226C<sub>His6</sub> und D269C<sub>His6</sub> und dem entsprechenden Heterodimergemisch wurde daraufhin beginnend mit 1/10 der molaren Menge BMH innerhalb von zehn Schritten in Abständen von 5min ein weiteres Zehntel der Menge des *Cross link*-Reagenzes zugesetzt, so daß sich insgesamt eine äquimolares Verhältnis ergab. In den letzten neun Schritten wurde eine entsprechend hohe BMH-Konzentration eingesetzt, um die Zugabe zu der Reaktionslösung möglichst gering zu halten (0,1µl). Die Ausbeuten an *Cross link*-Produkt zeigten keine Steigerung im Vergleich zu den vorherigen Tests.

Durch die relativ hohen Konzentrationen der Proteine mit Hexahistidintag ist es möglich, daß sich Aggregate gebildet haben, welche die *Cross link*-Reaktion behindern. Daher wurde das Reaktionsvolumen von 30µl auf 250µl beziehungsweise 750µl erhöht, wobei die gleiche molare Menge Enzym für den Test eingesetzt wurde. Nach der Reaktion wurden die Proben mit gleichem Volumen 20%iger (w/v) Trichloressigsäure (siehe auch 2.5.2) gefällt und anschließend in Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Dabei zeigte sich im Vergleich zwischen den Reaktionsansätzen, daß nach der Fällung eine geringere Menge an Protein auf dem Gel zu detektieren war als bei der Reaktion in 30µl-Volumina, die direkt aufgetragen werden konnten. Aufgrund der geringen Ausbeute der Fällungsreaktion ist es wahrscheinlich, daß ein *Cross link*-Produkt in seiner geringen Menge auf diese Weise nicht detektierbar ist.

Die Abstände der Aminosäuren wurde aus dem Enzym-DNA-Kokristall ermittelt [Kim *et al.*, 1990]. Um die Verhältnisse im Kristall zu imitieren, wurden die Proteinlösungen vor der *Cross link*-Reaktion mit äquimolarer Menge Oligonukleotid inkubiert (10min Raumtemperatur). Verwendet wurden das Oligonukleotid B/C, das eine spezifische Sequenz aufweist, und H/M, das nur unspezifische Sequenzen enthält (siehe auch 3.3). Analog zu den oben beschriebenen Experimenten wurde nach der Inkubation mit den Oligonukleotiden eine *Cross link*-Reaktion in 30µl-Reaktionsansatz ausgeführt. Dabei wurde in drei Schritten jeweils nach 10min Reaktionszeit ein weiteres

Aliquot BMH zugesetzt, so daß am Ende der Reaktion eine äquimolare Menge BMH zu *EcoRI* vorlag. Die Reaktion wurde mit wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>, K226C<sub>His6</sub> und D269C<sub>His6</sub> ausgeführt, jedoch zeigte sich in keinem der Ansätze ein *Cross link*-Produkt in der erwarteten Größe. In einem weiteren Test wurden ein 10facher und 100facher Überschuß des *Cross link*-Reagenzes eingesetzt, jedoch zeigte sich auch hier kein Produkt.

Die *Cross link*-Reaktionen sollten entsprechend der Abstände ihrer  $\alpha$ -C-Atome in den Heterodimeren K226C/D269C und D74C/K221C eher stattfinden als in den Homodimeren, bei in denen die Abstände zu groß sind. Ein detektierbarer Austausch von Untereinheiten erfolgt in der Restriktionsendonuklease *EcoRI* im Zeitraum von Tagen [Jeltsch, 1994], doch um ihn zu beschleunigen, können denaturierende Reagenzien zugesetzt werden. Guanidiniumhydrochlorid (Gua/HCl) führt in hohen Konzentrationen zum Verlust der Tertiärstruktur, sollte jedoch in geringerer Konzentration die Vermeidung von Aggregation und Quartärstruktur bewirken. Um den Einfluß verschiedener Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorid auf die Quartärstruktur von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> zu untersuchen, wurde das Enzym gegen den Puffer UZ2 (siehe 2.4.5) dialysiert, mit steigender Konzentration Guanidiniumhydrochlorid gemischt und in einem Gleichgewichtslauf in der Ultrazentrifuge untersucht (10000rpm; siehe 2.5.6). Abbildung 3.17 stellt die ermittelten Molekulargewichte in Abhängigkeit von den Konzentrationen dar.

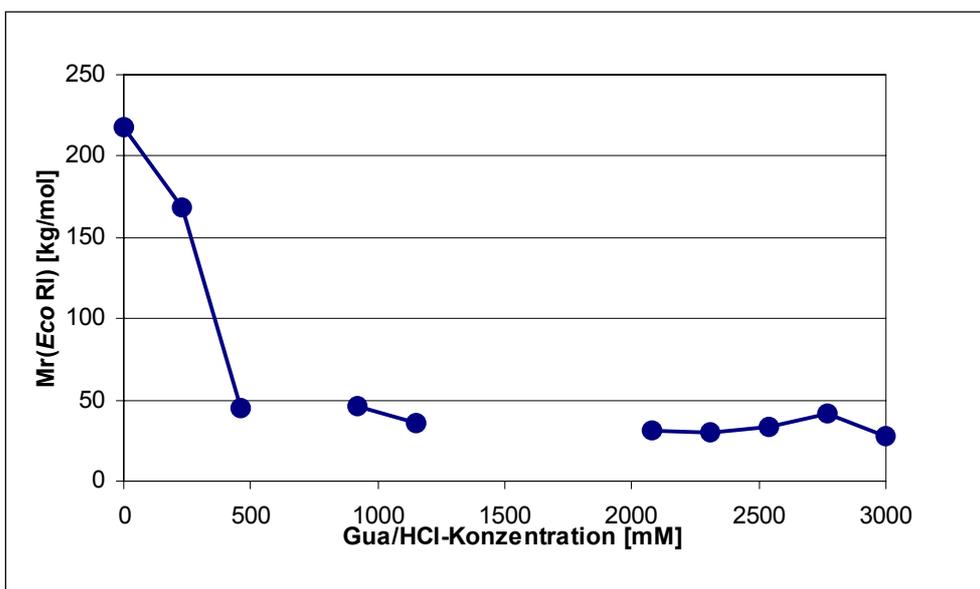


Abb. 3.17: Molekulargewicht von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> in Abhängigkeit von der Gua/HCl-Konzentration im Gleichgewichtslauf der Ultrazentrifuge bei 10000rpm

Dabei ergibt sich in der Lösung ohne Guanidiniumhydrochlorid für wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> ein Molekulargewicht von 217kg/mol. Das stellt einen Mittelwert zwischen den Massen dar und entspricht einem Aggregat von sieben Untereinheiten (vergleiche auch 3.1.3). Bei 230mM Guanidiniumhydrochlorid sinkt das Molekulargewicht auf 169kg/mol, ab

460mM ergibt sich eine Molmasse von durchschnittlich 36kg/mol, was als Monomer anzusehen ist.

Um einen Austausch der Untereinheiten zu fördern, das Enzym aber nicht vollständig zu denaturieren, wurden Konzentrationen von 150mM, 300mM und 600mM Guanidiniumhydrochlorid dem BMH-Dialysepuffer zugesetzt. Dialysiert wurden wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>, die Mutanten K226C<sub>His6</sub> und D269C<sub>His6</sub> und ein Heterodimergemisch beider Mutanten.

Um die Funktionalität der Proteine nach der Dialyse im Guanidiniumhydrochloridhaltigen Puffer zu testen, wurden eine  $\lambda$ -Kinetik ausgeführt (siehe 2.5.10). Bei keiner der Lösungen zeigte sich eine Veränderung der spezifischen Aktivität. Für das Heterodimergemisch K226C<sub>His6</sub>/D269C<sub>His6</sub> ist auch keine Veränderung zu erwarten, da die Homodimere eine vergleichbare Spaltaktivität (vgl. Tabelle 3.10) aufweisen.

Zu diesen Dialysaten wurde in analoger Weise in zehn Schritten eine äquimolare Menge BMH zugesetzt. Das Laemmliigel zeigte nur schwache Produktbanden bei folgenden Lösungen:

150mM Guanidiniumhydrochlorid: K226C<sub>His6</sub>, D269C<sub>His6</sub>

300mM Guanidiniumhydrochlorid: K226C<sub>His6</sub>/D269C<sub>His6</sub>, K226C<sub>His6</sub>

600mM Guanidiniumhydrochlorid: K226C<sub>His6</sub>/D269C<sub>His6</sub>

Die Hauptbande bei 31kDa war jedoch bei vielen Proben so gering, daß eine mögliche *Cross link*-Bande nicht zu sehen gewesen wäre. Es war insgesamt keine Verbesserung der *Cross link*-Ausbeute festzustellen.

#### 3.2.1.4 Erzeugung und Charakterisierung von Cystein-Doppelmutanten

Der Austausch von Untereinheiten, wie er durch die Zugabe von Gua/HCl versucht wurde, kann auch durch Mutationen im Enzym erreicht werden. Die Mutantenpaare L158D<sub>His6</sub> und I230K<sub>His6</sub> sowie L158K<sub>His6</sub> und I230D<sub>His6</sub> erwiesen sich als fähig, Heterodimere zu bilden [Vennekohl, 1996]. In Kombination mit den Cysteinmutanten ist es denkbar, die Heterodimerbildung zu fördern und die entstandenen Moleküle aus dem Gleichgewicht durch eine *Cross link*-Reaktion zu entfernen, und so die Reaktion in diese Richtung zu verschieben. So ergeben sich folgende Doppelmutanten-Kombinationen: L158D-K226C und I230K-D269C sowie L158K-K226C und I230D-D269C. Alle Mutanten wurden mit Hexahistidintag hergestellt.

Die Doppelmutanten wurden aus den Genen der Einzelmutanten durch Restriktionsspaltung (siehe 2.3.2) und Ligation (siehe 2.3.3) der entsprechenden Fragmente erhalten. Die Expression erfolgte nach Transformation von TGE900pEcoR4 (siehe 2.2.4). Die Proteinvarianten wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 2.4.3) und gegen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5). Tabelle 3.12 stellt die

Konzentrationen der Doppelmutanten gegenüber.

Tab. 3.12: Konzentrationen und Reinheitsgrade der Cystein-Doppelmutanten

Protein	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Reinheit
L158D-K226C <sub>His6</sub>	6,2	>95%
I230K-D269C <sub>His6</sub>	0,7	$\approx$ 85%
L158K-K226C <sub>His6</sub>	4,6	>95%
I230D-D269C <sub>His6</sub>	0,7	$\approx$ 85%

Doppelmutanten, welche die Mutation D269C enthielten, zeigten in der Aufreinigung ein abweichendes Verhalten. Sie ergaben nach Ultraschallzellaufschluß (siehe 2.4.2) und nachfolgender Zentrifugation eine erhebliche Menge des Proteins im Zellpellet, während im Überstand nur ein kleiner Teil des Fusionsproteins enthalten war. Eine Erhöhung des Salzgehaltes im Aufschlußpuffer von 0,5M auf 1M NaCl steigerte die Ausbeute an löslichem Protein, das anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt wurde. Die erhaltenen Lösungen enthielten jedoch zusätzliche Proteinbanden, die sich nicht abreinigen ließen (vergleiche auch D269K<sub>His6</sub>).

Um die Sekundärstrukturanteile dieser Mutanten zu ermitteln, wurde CD-Spektroskopie durchgeführt. Für die Doppelmutanten I230K-D269C<sub>His6</sub> und I230D-D269C<sub>His6</sub> konnte aufgrund der geringen Konzentration kein Spektrum erhalten werden. Bei den Doppelmutanten L158D-K226C<sub>His6</sub> und L158K-K226C<sub>His6</sub> wurde das Spektrum durch eine Verunreinigung im Dialysepuffer überdeckt (vergleiche auch 3.1.2.2), die eine Auswertung des Spektrums im Bereich um 210nm verhinderte. Diese Experimente müssen mit neuen Enzympräparationen nachgeholt werden.

Die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität wurde mit  $\lambda$ -DNA unter verschiedenen Pufferbedingungen ausgeführt (siehe 2.5.10). Die Ergebnisse für den Standard-Spaltpuffer sind in Tabelle 3.13 dargestellt. Die Werte in Klammern geben die Konzentrationen der Enzyme im Test an. Die spezifische DNA-Bindungskonstante wurde bei Raumtemperatur mit einem Gelretardations-Assay (siehe 2.5.9) ermittelt (siehe Tabelle 3.13).

Die Mutanten wiesen eine leicht verminderte spezifische Aktivität oder Bindungskonstante auf. Die Einzelmutanten zeigten kaum Abweichungen vom wt-Verhalten, doch in der Summe ergibt sich nun eine leichte Verschlechterung der Doppelmutanten im Vergleich zum wt-Enzym.

Eine Besonderheit zeigte L158D-K226C<sub>His6</sub>, die bei 37°C in der Lage ist, ein vollständiges Spaltmuster zu erzeugen, das jedoch schon zu Beginn an durch unspezifische Nukleaseaktivität abgebaut wird. Insgesamt weist diese Mutante jedoch eine größere Stabilität auf als die Einzelmutante L158D<sub>His6</sub>.

Tab. 3.13: Spezifische Spaltaktivitäten und Bindungskonstanten der Cystein-Doppelmutanten

Protein	spezifische Spaltaktivität [U/mg]	spez. Bindungskonstante [M <sup>-1</sup> ]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	3,7 · 10 <sup>6</sup> (0,3nM)	4,5 · 10 <sup>8</sup>
L158D-K226C <sub>His6</sub>	1,1 · 10 <sup>4</sup> (283nM)*	6,0 · 10 <sup>5</sup>
I230K-D269C <sub>His6</sub>	6,9 · 10 <sup>5</sup> (2,3nM)	4,2 · 10 <sup>6</sup>
L158K-K226C <sub>His6</sub>	1,0 · 10 <sup>5</sup> (15,3nM)	1,5 · 10 <sup>7</sup>
I230D-D269C <sub>His6</sub>	1,2 · 10 <sup>6</sup> (2,6nM)	7,0 · 10 <sup>8</sup>

\* Die Spaltung geht über in eine unspezifische Nukleaseaktivität.

### 3.2.1.5 Cross link-Experimente mit Cystein-Doppelmutanten

Unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse für Cystein-Einzelmutanten im *Cross link*-Ansatz mit BMH, wurde eine entsprechende Reaktion der Doppelmutanten unter Zusatz von spezifischem Oligonukleotid B/C in einem Volumen von 40µl ausgeführt. Aufgrund der geringen Konzentrationen der Doppelmutanten I230K-D269C<sub>His6</sub> und I230D-D269C<sub>His6</sub> war keine ausgeprägte Variation in den Ansätzen möglich. BMH wurde in drei Schritten der Reaktionslösung zugefügt, wobei in einem Ansatz die äquimolare Menge, in dem anderen ein 100facher Überschuß verwendet wurde. Abbildung 3.18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für die Doppelmutanten I230K-D269C<sub>His6</sub> und L158D-K226C<sub>His6</sub> sowie deren Heterodimer (Inkubation des Gemischs der Lösungen der Homodimere über Nacht bei 4°C).

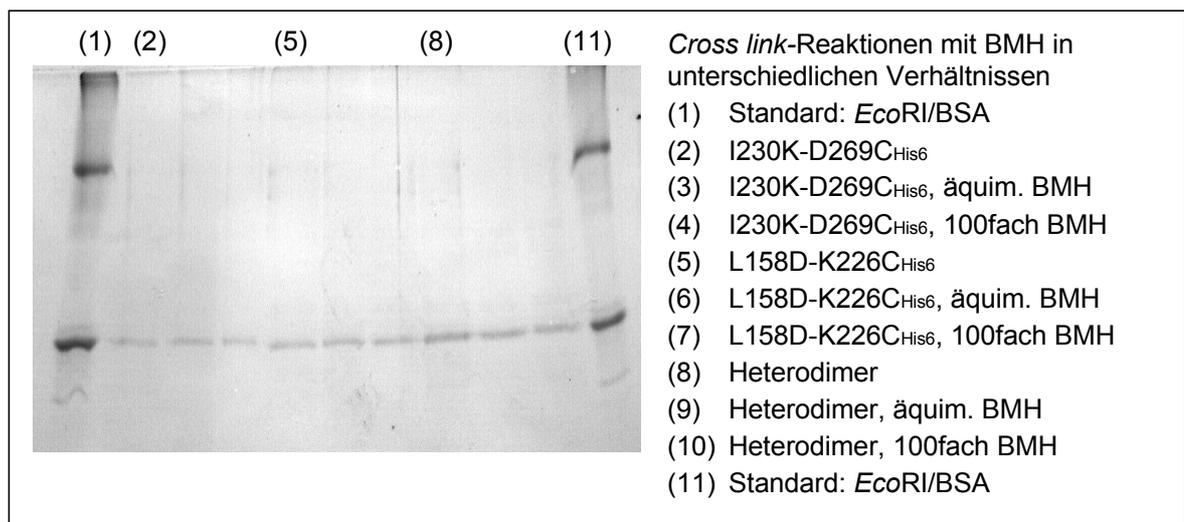


Abb. 3.18: BMH *Cross link*-Reaktionen mit I230K-D269C<sub>His6</sub> und L158D-K226C<sub>His6</sub> sowie deren Heterodimer

Im Vergleich zu den Proteinlösungen ohne den Zusatz des *Cross link*-Reagenzes waren keine Unterschiede zu den beiden folgenden Bahnen zu erkennen, bei denen

BMH zugesetzt wurde. Die Reaktion mit dem potentiellen Heterodimer unterschied sich in keiner Weise von denen der Homodimere.

Auf weitere *Cross link*-Versuche wurden aufgrund geringer Ausbeuten und schlechter Reproduzierbarkeit verzichtet.

### 3.2.2 Erzeugung einer heterodimeren *EcoRI* durch Koexpression in *E.coli*

Der Austausch von Untereinheiten beim wt-Enzym erfolgt nur langsam. Durch Koexpression beider Untereinheiten innerhalb einer Zelle können sie aus dem Rohaufschluß isoliert werden. Um jedoch das entstehende Gemisch aus Homo- und Heterodimeren der Untereinheiten A und B zu trennen ( $AB:A_2:B_2 = 2:1:1$ ), müssen sie mit unterschiedlichen *Affinitätstags* (hier *Hexahistidintag* und *StrepTag II*) ausgestattet sein, so daß eine Aufreinigung über zwei nacheinander geschaltete Affinitätsmaterialien möglich ist.

Um die gewünschten Untereinheiten in der Zelle zu exprimieren, müssen beide Gene vorhanden sein. Eine Möglichkeit hierzu bietet ein drei-Plasmid-System (zwei Plasmide mit je einem *ecoRI*-Gen, pEcoR4 mit der *EcoRI*-Methylase). Dabei müssen die Replikationsursprünge der Plasmide zueinander kompatibel sein und die beiden *ecoRI*-Gene in möglichst gleicher Anzahl vorliegen.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung einer polycistronischen *Message*, wie sie in *E.coli* häufig vorkommt. Dabei werden zwei oder mehr Gene durch einen Promotor kontrolliert und als Gesamt-mRNA-Molekül abgelesen. Die Abstände dieser Gene sind sehr variabel (Überlappung von bis zu 7bp bis zu einer Entfernung von 100bp).

#### 3.2.2.1 Konstruktion der polycistronischen *Message*

Mittels *Gapped duplex*-Mutagenese (siehe 2.3.7) wurde in den Vektor pRIS<sub>Strep</sub> 21bp hinter dem *ecoRI*-Gen eine *NheI*-Spaltstelle eingeführt (Benennung des entstehenden Vektors: pRSN). Der durch die Spaltung dieser Restriktionsendonuklease entstehende Überhang ist zu jenem von *XbaI* kompatibel, deren Spaltstellen das *ecoRI*-Gen auf pRIF309+ umgeben. Somit ist eine Klonierung eines *XbaI*-Fragmentes in den mit *NheI* linearisierten Vektor möglich. Durch die Ligation wird die *NheI*-Schnittstelle zerstört, so daß sie in Gegenwart von *NheI* ausgeführt werden kann, um die Ausbeute an positiven Klonen zu erhöhen. Das entstehende Plasmid mit zwei wt-Genen (pRSNX(wt/wt)), hat eine Länge von 5899bp und enthält hinter dem P<sub>L</sub>-Promotor zunächst das *ecoRI*<sub>StrepII</sub>-Gen, danach in einem Abstand von 27bp zum folgenden Startcodon das *ecoRI*<sub>His6</sub>-Gen. Beide Gene verfügen über ihre eigene Shine Dalgarno-

Sequenz.

Für die Herstellung von Konstrukten mit zwei mutierten Untereinheiten muß zunächst der Vektor pRSN mit der entsprechenden Mutation versehen werden, bevor die Ligation mit dem zweiten Gen vorgenommen wird, da durch die doppelt auftretenden Sequenzen in pRSNX keine Mutagenese innerhalb eines Gens mehr möglich ist.

### 3.2.2.2 Aufreinigung der koexprimierten Heterodimeren

Nach der Transformation von TGE900pEcoR4 (siehe 2.2.4) wurde mit einem expressionspositiven Klon eine Fermentation im 8l-Maßstab durchgeführt (siehe 2.4.1). Nach dem Ultraschallzellaufschluß erfolgte zunächst eine Aufreinigung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätssäule (siehe 2.4.3.1), welche die homodimeren Untereinheiten mit *StrepTag II* nicht bindet. Das Eluat der Säule enthält somit die Heterodimere und das Homodimer der Untereinheiten mit Hexahistidintag. Nach Einstellung der Pufferbedingungen wurde es auf *StrepTactin* aufgetragen (siehe 2.4.3.2). Da die Abtrennung der Homodimeren mit *StrepTag II* bereits durch die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätssäule erfolgte können nur noch die gewünschten Heterodimere am *StrepTactin* binden. Das Eluat wurde gegen einen glyzerinhaltigen Puffer dialysiert (siehe 2.4.5).

Die Konzentration von wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>/wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> (wt<sub>StrepII</sub>/wt<sub>His6</sub>) wurde zu 1,1 µM bestimmt bei einer Reinheit von über 95%.

In gleicher Weise wurde wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>/D91A<sub>His6</sub> (wt<sub>StrepII</sub>/D91A<sub>His6</sub>) erhalten und zu einer Konzentration von 1,7 µM (>95% Reinheit) aufgereinigt.

### 3.2.2.3 Charakterisierung der heterodimeren Proteine

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Affinitätstags an einem Enzym einen detektierbaren Einfluß ausüben, wurden Untersuchungen zunächst mit wt<sub>StrepII</sub>/wt<sub>His6</sub>, im Anschluß daran mit wt<sub>StrepII</sub>/D91A<sub>His6</sub> ausgeführt.

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurde CD-Spektroskopie ausgeführt. Aufgrund der geringen Konzentrationen konnten jedoch keine auswertbaren Signale erhalten werden. Diese Messungen müssen nach erneuter Präparation der Mutanten wiederholt werden.

Die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität erfolgte auf dem Substrat λ-DNA (siehe 2.5.10). DNA-Bindung wurde mit einem Gelretardations-Assay ermittelt (2.5.9). Die spezifischen Aktivitäten unter Standard-Spaltbedingungen und DNA-Bindungskonstanten sind in Tabelle 3.14 den Werten für die Homodimere gegenübergestellt. Die Werte für die Mutante D91A<sub>His6</sub> sind Grabowski *et al.* (1995) entnommen.

Tab. 3.14: Spezifische Spaltaktivitäten und Bindungskonstanten heterodimerer *EcoRI* im Vergleich zu den Homodimeren

Protein	spezifische Spaltaktivität [U/mg]	spez. Bindungskonstante [ $M^{-1}$ ]
wt- <i>EcoRI</i> <sub>His6</sub>	$2,7 \cdot 10^6$ (0,72nM)	$4,7 \cdot 10^8$
wt- <i>EcoRI</i> <sub>StreptII</sub>	$3,7 \cdot 10^6$ (0,55nM)	$2,8 \cdot 10^8$
D91A <sub>His6</sub>	keine Spaltaktivität	$1,9 \cdot 10^8$
wt <sub>StreptII</sub> /wt <sub>His6</sub>	$3,7 \cdot 10^6$ (0,55nM)	$6,4 \cdot 10^7$
wt <sub>StreptII</sub> /D91A <sub>His6</sub>	Beginn einer Spaltung	$1,3 \cdot 10^8$

In der spezifischen Spaltaktivität von wt<sub>StreptII</sub>/wt<sub>His6</sub> wurde kein Unterschied zu den beiden homodimeren wt-Enzymen festgestellt, die spezifische Bindungskonstante ist jedoch für das Heterodimer etwas geringer.

Das Heterodimer wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub> dagegen wurde eine Bindungskonstante ermittelt, die den beiden wt-Enzymen entspricht. Auf  $\lambda$ -DNA konnte jedoch keine spezifische Aktivität ermittelt werden, da das Enzym die Spaltung nicht beendete. Daher wurden Spaltexperimente mit dem Substrat pUC18 ausgeführt, das nur eine *EcoRI*-Erkennungssequenz enthält. Ist die Spaltaktivität nur auf die unveränderte Untereinheit zurückzuführen, so ergibt sich ein Enzym, das den Doppelstrang nicht mehr konzertiert spalten kann. In einem solchen Fall kann eine Akkumulation des offen-zirkulären Plasmids beobachtet werden. Durch die Verwendung von Reaktionsbedingungen, in denen wt-*EcoRI* zu *Star*-Aktivität neigt, kann unter Umständen die Aktivität der Mutante erhöht werden.

In einer Langzeitkinetik über 23h bei pH8,8 konnte eine Spaltung des Substrates pUC18 beobachtet werden. Neben der linearen Bande erschien der Anteil an offen-zirkulärem Plasmid erhöht, so daß von einer residuellen Spaltaktivität des Heterodimers ausgegangen werden kann.

Aufgrund der geringen Spaltaktivität des Enzyms ist jedoch eine genauere Charakterisierung der Spalteigenschaften nicht möglich. Es ist daher eine erneute Präparation erforderlich, so daß durch eine unter Umständen höhere Enzymkonzentration die Erzeugung von Spaltprodukt in kürzeren Zeiten möglich wird.

### 3.3 DNA-Bindungseigenschaften synthetischer *Extended chain*-Peptide

Der Kristallstruktur der Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist zu entnehmen, daß die *Extended chain*-Motive beider Untereinheiten (Met137 bis Arg145) durch die große Grube der DNA zur Position Arg145 führen. Dabei wird eine Vielzahl von Kontakten ausgebildet, die für die spezifische DNA-Erkennung essentiell sind (siehe Abbildung 3.19).

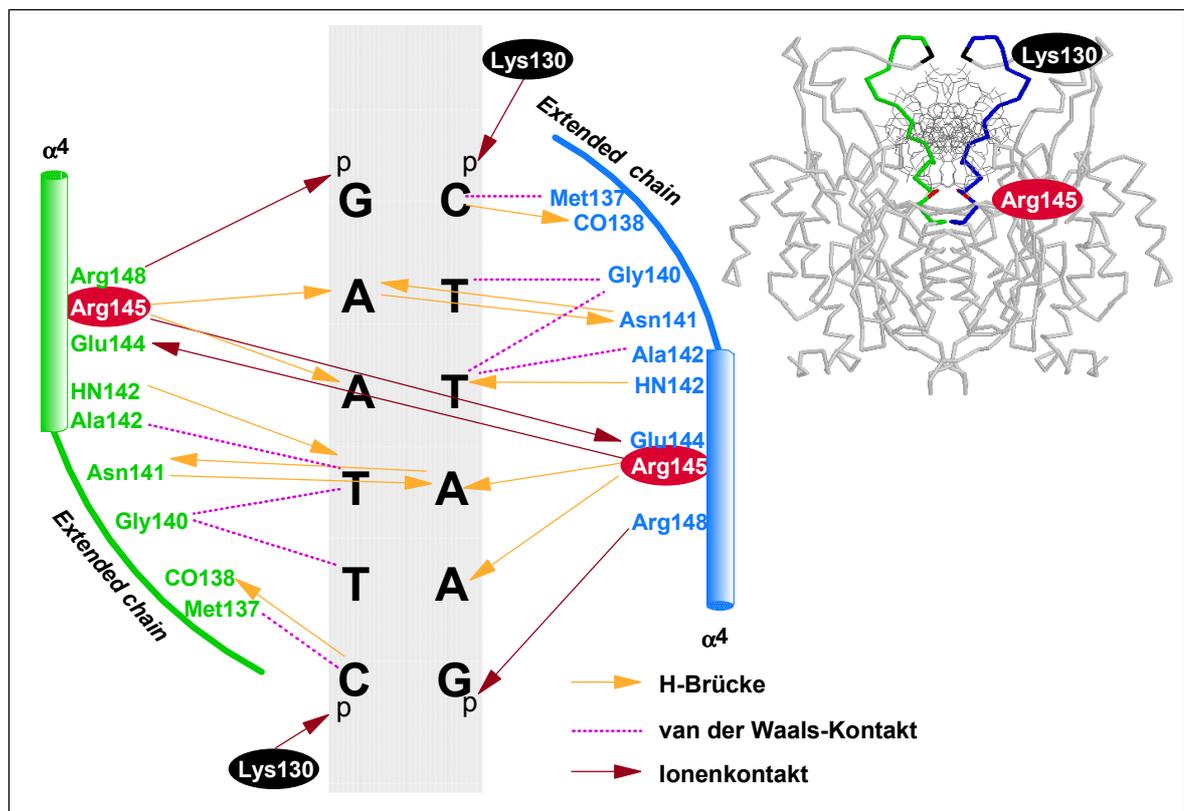


Abb. 3.19: Position und Kontakte des *Extended chain* in der *EcoRI*-DNA-Kokristallstruktur

Es konnte gezeigt werden, daß ein Peptid, das die Aminosäuresequenz des *Extended chain*-Motivs aufweist, schwach aber spezifisch an die *EcoRI*-Erkennungssequenz bindet [Jeltsch *et al.*, 1995b]. Nach Nitrozellulose-Filterbindung, CD-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie sowie Fluoreszenzmessungen ergab allein die Inhibierung der Spaltaktivität verschiedener Restriktionsendonukleasen durch das Peptid einen Effekt, aus dem eine Bindungskonstante von  $3 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$  geschätzt wurde.

Innerhalb der Kristallstruktur wurden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren Arg145 und Glu144 beider Untereinheiten postuliert, die für die Positionierung der *Extended chain* wichtig sind (Abbildung 3.20).

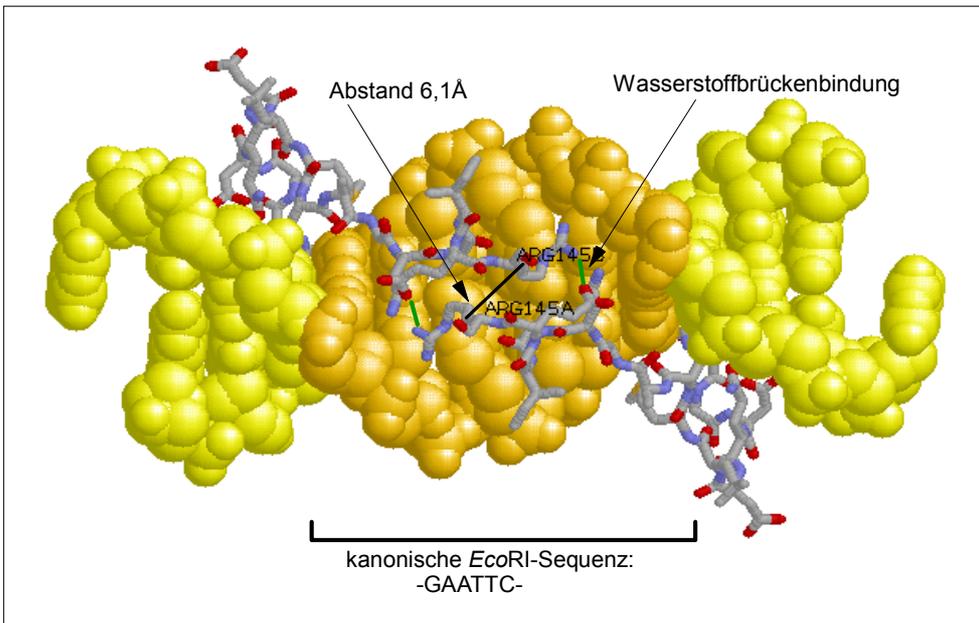


Abb. 3.20: Position der Aminosäuren Arg145 und Glu144 relativ zur DNA

Die beiden *Extended chain*-Motive kommen sich in den Positionen Arg145 beider Untereinheiten auf einen Abstand von 6,1Å nahe. Um die Verhältnisse im Kristall zu imitieren, wurde für die Peptidsynthese ein Ansatz entwickelt, der die beiden Arme des *Extended chain*-Motivs durch einen *Linker* verbindet. Gewählt wurden Verbindungsstücke mit unterschiedlicher Anzahl von CH<sub>2</sub>-Gruppen: Diaminopropionsäure (DAP, eine CH<sub>2</sub>-Gruppe, Suffix C1, etwa 4,3 Å), Diaminobuttersäure (DAB, zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen, Suffix C2, etwa 5,8 Å), Ornithin (drei CH<sub>2</sub>-Gruppen, Suffix C3, etwa 7,3 Å) und Lysin (vier CH<sub>2</sub>-Gruppen, Suffix C4, etwa 8,8 Å). Abbildung 3.21 stellt die entsprechenden Strukturen gegenüber.

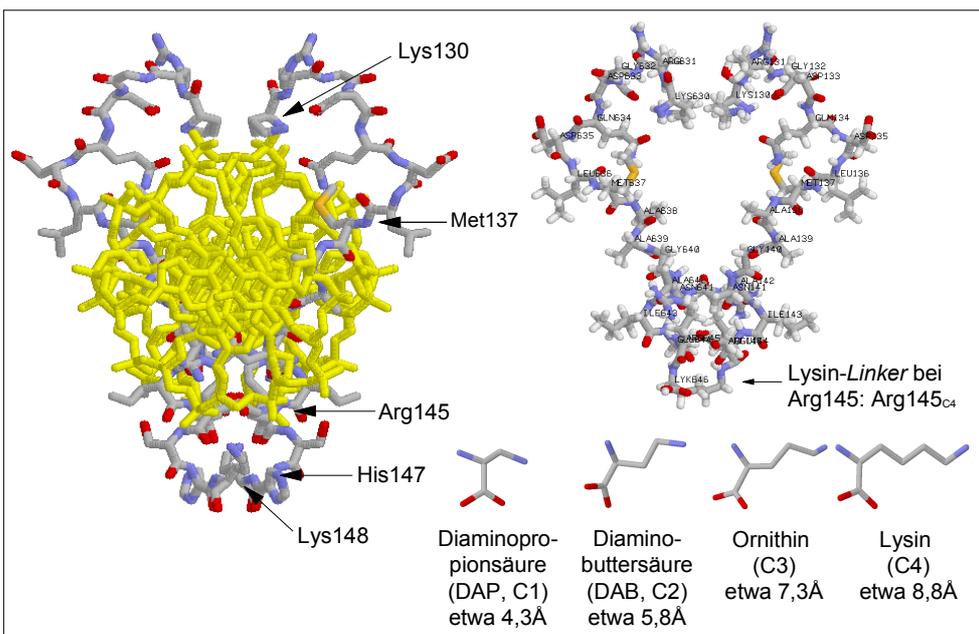


Abb. 3.21: Vergleich der bidentaten Peptide und ihrer *Linker* zur Struktur des *Extended chain*-Motivs in der *EcoRI*-Röntgenstruktur

Monodentate Peptide können erst im Anschluß an die DNA-Bindung miteinander wechselwirken. Durch die Verknüpfung der Peptidarme ist dies bereits durch ein einzelnes Bindungsereignis erreichbar, und es sollte sich eine verbesserte Bindung im Vergleich zu den monodentanten Varianten ergeben.

Die DNA-Bindungseigenschaften der bidentaten Peptide wurden sowohl in einem Zwei-Phasen-System (immobilisierte Peptide auf einer Zellulosemembran; siehe 3.3.1) als auch mit freien Peptiden in Lösung (siehe 3.3.2) vergleichend zu den entsprechenden monodentaten Verbindungen untersucht.

### 3.3.1 Bindungsexperimente immobilisierter Peptide mit Oligonukleotiden

Die Membranen wurden nach der *Spot synthesis*-Methode [Frank, 1990; Frank & Overwin, 1996] hergestellt. Die *Spots* sind auf einer Zellulosemembran in einem Raster von 25x17 angeordnet. Somit ergibt sich eine Anzahl von 425 *Spots* bei einer Größe der Membran von 8x12cm.

#### 3.3.1.1 Membran A

Die zu testenden Aminosäuresequenzen sollen für jeden der vier oben erwähnten *Linker* untersucht werden. In der Kristallstruktur befinden sich die Aminosäuren Arg145 in einem Abstand von 6,1Å zueinander, es ist jedoch möglich, daß für die Peptidarme ein anderer Abstand optimal ist. Daher wurden *Linker* unterschiedlicher Länge getestet (vergleiche Abbildung 3.21: 3,4Å bis 8,8Å). So ergibt sich für die Aufteilung der Peptidsequenzen in der immobilisierten Bibliothek eine Anzahl von vier Reihen pro *Linker*. Abbildung 3.22 zeigt eine Übersicht über die Belegung der Membran. Alle folgenden Erläuterungen beziehen sich auf die Reihen 1 bis 4, sie gelten jedoch ebenso für die Reihen 5-8, 9-12 und 13-16.

Da es sich um ein völlig neues Verfahren für die Untersuchung der Bindung von Oligonukleotiden an immobilisierte Peptide handelt, kann im Voraus keine Aussage über die für eine effiziente Bindung benötigte Anzahl der Aminosäuren gemacht werden, jedoch ist anhand der Kristallstruktur die sinnvolle Länge bis Lys130 beschränkt. Zusätzlich muß beachtet werden, daß die Zuverlässigkeit der Synthese langer Peptide nur bis zu einer Anzahl von etwa 20 Aminosäuren gewährleistet ist.

Die Peptidsequenzen wurden daher in Gruppen zu acht Peptiden unterteilt, welche die gleiche Sequenz aufweisen, jedoch von *Spot* zu *Spot* über eine Aminosäure mehr verfügen (Arg145→Met137, Arg145→Leu136 bis zu Arg145→Lys130). Die *Spots* der Positionen 1, 9 und 17 weisen somit eine Länge von neun Aminosäuren auf ( $R^{145}EIANGAAM^{137}$ ), während die *Spots* der Positionen 8, 16 und 24 eine Anzahl von 16 Aminosäuren ( $R^{145}EIANGAAM^{137}LDQDGRK^{130}$ ) hinter dem *Linker* tragen.

		Längen Arg145-Met137 bis Arg145-Lys130							Längen Arg145-Met137 bis Arg145-Lys130							Längen Arg145-Met137 bis Arg145-Lys130													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2		
	1	wt-Sequenzen							Ala142Gly							Ala142 <b>Asp</b>													
DAP	2	Asn141Ala							Asn141 <b>Asp</b>							Asn141Tyr													
C1	3	Gly140Leu							②	<b>Asp</b> 135Ala						Met137Ala			<b>Asp</b> 133Ala										
	4	Ala142Phe					①	③	<b>Asp</b> 135Lys						<i>Random</i> 9			<i>Random</i> 13											
	5	Belegung der Reihen analog zu DAP																											
DAB	6																												
C2	7																												
	8	Belegung der Reihen analog zu DAP																											
	9																												
Orn.	10																												
	11	Belegung der Reihen analog zu DAP																											
C3	12																												
	13																												
	14	Belegung der Reihen analog zu DAP																											
Lys.	15																												
C4	16																												
	17	Z U F A L L S P E P T I D E																											

Abb. 3.22: Peptidbibliothek der Membran A; ① Arg131**Glu**, ② Asn141Phe, ③ Met137His; basische Aminosäuren sind *kursiv*, saure **fett** dargestellt.

Neben der wt-Sequenz (Peptidbibliothek Reihe 1, Gruppe 1) wurden verschiedene Mutationen in die Peptide eingebracht, um das daraus resultierende veränderte Bindungsverhalten zu testen. Dabei wurden zum Teil Mutationen gewählt, von denen die Auswirkungen auf die Eigenschaften der Restriktionsendonuklease *EcoRI* bereits bekannt sind:

- Die Aminosäure Ala142 bildet im Homodimer *EcoRI* eine Wasserstoffbrückenbindung zum inneren Thymin und eine van der Waals-Wechselwirkung zur Methylgruppe desselben Thymins aus. Ein Glycin an dieser Stelle (Peptidbibliothek Reihe 1, Gruppe 2) führt zu einer Reduktion des Kontaktes, da das kleine Glycin nicht den Raum des Alanins ausfüllen kann. Die Proteinvariante A142G verfügt nur noch über eine geringe spezifische Aktivität ( $2 \cdot 10^3 \text{U/mg}$ ) [Küster, 1998]. Die Einführung eines Aspartats (Peptidbibliothek Reihe 1, Gruppe 3) bringt eine zusätzliche negative Ladung in die Nähe der DNA. Diese Mutante ist auf Proteinebene inaktiv [Küster, 1998]. Durch ein Phenylalanin (Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 1) wird eine sehr große Aminosäure statt des Alanins eingeführt.

- Asn141 bildet in *EcoRI* eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zum äußeren Adenin. Weiterhin werden durch die Carbonylfunktion Wasserstoffbrückenbindungen zum inneren und äußeren Adenin ausgebildet. Der Ersatz dieser Aminosäure durch Alanin (Peptidbibliothek Reihe 2, Gruppe 1) verhindert die Ausbildung dieser Kontakte, da die Carbonylgruppe entfernt wird. Die Proteinvariante N141A ist unter Standardbedingungen inaktiv [Fritz, 1992]. Analoges Verhalten findet sich für N141D (Peptidbibliothek Reihe 2, Gruppe 2) [Fritz, 1992]. Hier ist die Carbonylfunktion noch vorhanden, jedoch wird durch die Einführung der negativen Ladung die DNA-Bindung durch das Enzym erschwert. Ebenso sollte der Kontakt durch eine aromatische Aminosäure (Asn141Tyr: Peptidbibliothek Reihe 2, Gruppe 3; Asn141Phe: Peptidbibliothek Reihe 3, Gruppe 2) nicht ausgebildet und durch die Größe wird das Peptid von der DNA weggedrückt werden.
- Die Aminosäure Gly140 bildet in *EcoRI* einen van der Waals-Kontakt zur Methylgruppe des äußeren Thymins. Durch die Größe der Aminosäure Leucin an dieser Position (Peptidbibliothek Reihe 3, Gruppe 1) wird das Peptid von der DNA weggedrückt.
- Met137 bildet in *EcoRI* einen van der Waals-Kontakt zum Cytosin aus. Durch die kleine Aminosäure Alanin (Peptidbibliothek Reihe 3, Gruppe 3) kann dieser Kontakt nicht hergestellt werden, die Proteinvariante besitzt eine spezifische Aktivität von nur  $1,4 \cdot 10^4 \text{U/mg}$  [Küster, 1998]. Der Ersatz des Methionins durch Histidin (Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 2), das nahezu den gleichen Platzbedarf wie Methionin aufweist, bringt eine positive Ladung an die DNA. Diese Mutante zeigt eine spezifische Aktivität von  $8 \cdot 10^2 \text{U/mg}$  [Küster, 1998].
- Die Aminosäuren Asp133 und Asp135 sind ein Teil der *Inner arm*-Struktur der *EcoRI* und bilden eine potentielle Magnesiumbindungsstelle. Durch den Ersatz mit Alanin (Asp135Ala: Peptidbibliothek Reihe 3, Gruppe 2; Asp133Ala: Peptidbibliothek Reihe 3, Gruppe 3) können diese Kontakte nicht mehr ausgebildet werden. Auf Proteinebene hat daher D133A nur eine geringe Aktivität ( $3 \cdot 10^4 \text{U/mg}$ ) [Oelgeschläger, 1992]. Der Austausch der negativen Ladung des Aspartats durch eine positive in einem Lysin (Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 2) sollte zu einer Attraktion der DNA führen.
- Mit dem Austausch des Arg131 gegen Glutamat (Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 1) wird eine positive Ladung durch eine negative ersetzt. Die Proteinvariante R131E zeigte eine reduzierte spezifische Spaltaktivität ( $2 \cdot 10^4 \text{U/mg}$ ) [Windolph *et al.*, 1997b] und eine in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen leicht gesteigerte Bindungskonstante.

Um einen Nachweis für die sequenzunabhängige unspezifische Bindung der Oligonukleotide durch die Aminosäuren der Peptide zu erhalten, wurden Kontrollpeptide erstellt. Sie sind aus den gleichen Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge zusammen-

gesetzt. Da auch die unspezifische Bindung von der Länge der Peptide abhängen kann, wurden neun (*Random9*: Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 4), 13 (*Random13*: Peptidbibliothek Reihe 4, Gruppe 3) und 16 Aminosäuren (Peptidbibliothek Reihe 17, Gruppen 1 bis 3) gewählt. Die Aminosäuren Arg145 und Glu144 wurden dabei nicht variiert, da sie für die Ausrichtung der Peptide entlang der DNA sorgen sollen. Als zusätzliche Kontrolle werden alle Bindungsexperimente mit einem spezifischen (BioDickAT) und einem unspezifischen Oligonukleotid (BioAntiDickAT) ausgeführt werden, um spezifische von unspezifischer Bindung unterscheiden zu können (für die Sequenzen siehe Tabelle 2.9).

Bei den Messungen für beide Oligonukleotide handelt es sich um getrennte, nacheinander ausgeführte Experimente auf der gleichen Membran (siehe 2.6.1.2). Die Farbreaktion für das an die Oligonukleotide gebundene Biotin ist nicht immer mit gleicher Effizienz ausführbar, Inkubationszeiten und Intensität der Färbung korrelieren nicht. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Experimenten zu ermöglichen, ist es daher nötig, sich auf einen Standard zu beziehen, dessen Färbung unabhängig vom eingesetzten Oligonukleotid und den Reaktionsbedingungen ist. Dies ist mit Biotin direkt möglich, das als solches und als Biotinester auf der Membran neben den *Spots* immobilisiert wurde (jeweils drei *Spots* in einer Verdünnungsreihe, 2M, 0,2M und 0,02M). Durch eine Normierung der Ergebnisse auf die Färbung eines dieser *Spots* sollte ein Vergleich zwischen einzelnen Experimenten möglich sein.

In der Messung des zeitlichen Verlaufs der Farbreaktion hat sich gezeigt, daß die Färbung durch das Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat eine Sättigung erreichen kann. Betrifft das einen der Referenzpunkte, ergibt sich daraus eine Verfälschung der Meßwerte, da die schwächer gefärbten *Spots* gegen den Referenzpunkt aufholen. Daher ist es nötig, einen *Spot* mit nur geringer Konzentration als Referenz zu wählen (1:100-Verdünnung des Biotinesters).

Um einen Puffer zu ermitteln, in dem die Oligonukleotide eine möglichst gute Bindungseffizienz an die immobilisierten Peptide aufweisen, und gleichzeitig nur einen geringen Hintergrund an Färbung liefern, wurden verschiedene Puffer getestet (siehe Tabelle 2.10). Dabei stellte sich heraus, daß bereits die Farbreaktion des Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats mit den Peptiden stark von der Pufferzusammensetzung abhängt, entweder. In Abbildung 3.23 ist exemplarisch die Farbreaktionen der Membran A im Phosphatbindungspuffer (100mM NaCl) dargestellt.

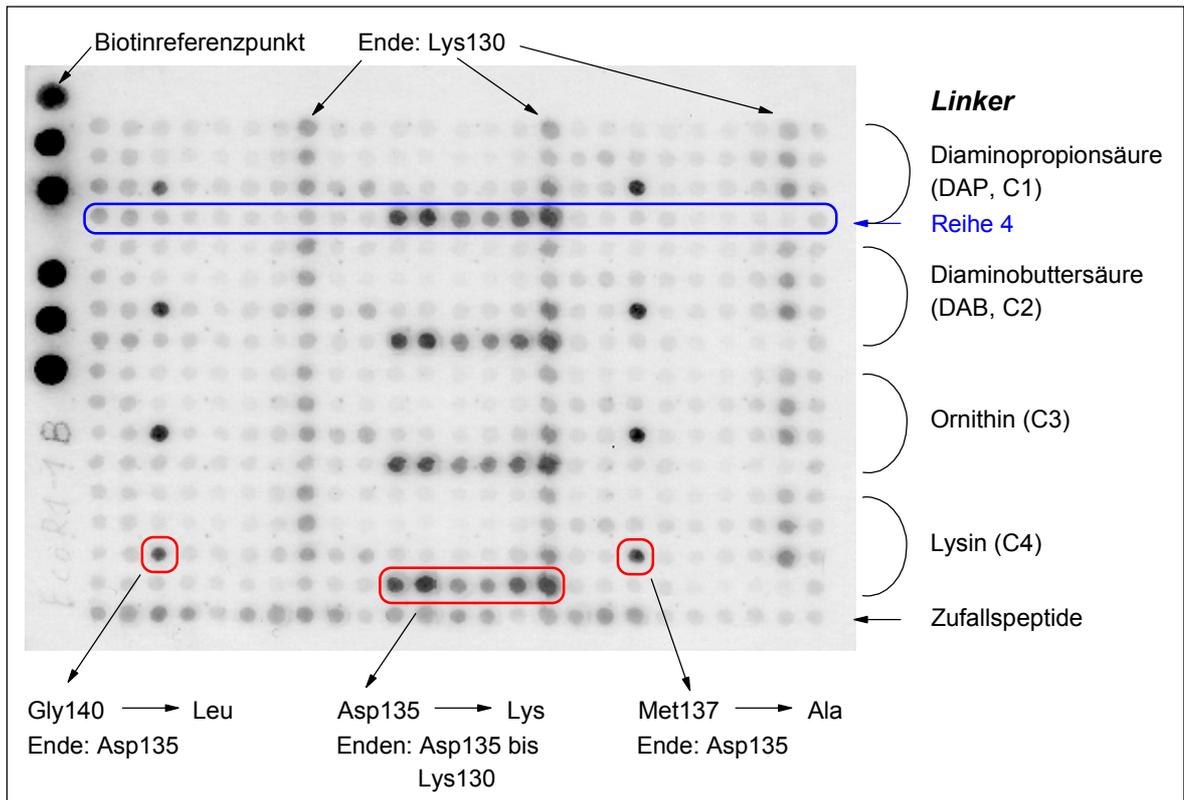


Abb. 3.23: Farbreaktion der Membran A mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat ohne Zusatz von Oligonukleotid

Die Membran weist in der Färbung eine hohe Symmetrie auf, was die Wiederholung der Peptidsequenzen für die verschiedenen *Linker* widerspiegelt. Einige *Spots* zeigen in jedem der getesteten Bindungspuffer bereits eine ausgeprägte Farbreaktion auch ohne Zusatz von Oligonukleotid. Allerdings ergab sich im Vergleich der Puffer ein starker Unterschied im Ausmaß der Färbung sämtlicher *Spots*. Abbildung 3.24 stellt die normierten Werte für die *Spots* der Reihe 4 gegenüber (vergleiche Abbildung 3.23, blauer Kasten), welche die sechs ausgeprägten Farbreaktionen der Mutation Asp135Lys enthält.

Der Zusatz von Magnesium setzt schon in kleinen Mengen die Anfärbbarkeit der *Spots* deutlich nach oben (hinterste Reihen). Der Zusatz von Tween-20 (0,05%) im Bindungspuffer ergibt eine leichte Abschwächung der Reaktion. Die Erhöhung der Salzkonzentration im Tris-Puffersystem von 50mM auf 100mM senkt die Bindung des Konjugats auf einen sehr niedrigen Level. Ein vergleichbarer Phosphatpuffer zeigt demgegenüber eine etwa dreifache Erhöhung des Hintergrunds. Als Bindungspuffer wurde daher 20mM Tris/HCl pH7,5/100mM NaCl/20mM EDTA/0,05% (w/v) Tween-20 verwendet.

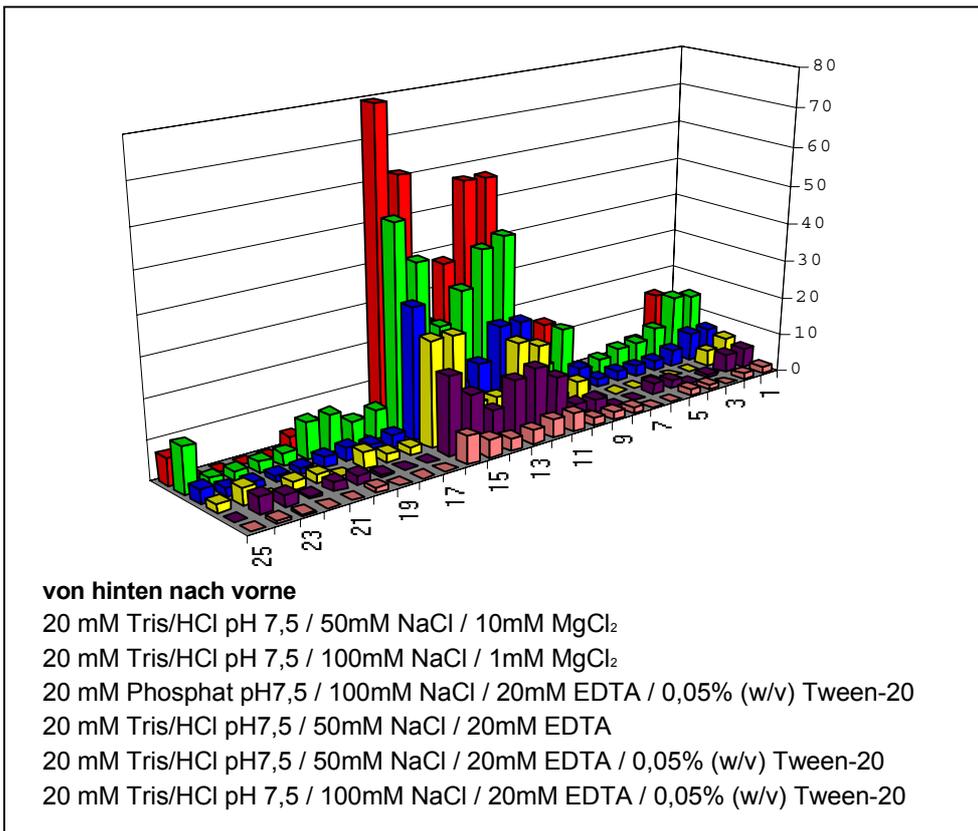


Abb. 3.24: Farbreaktionen der Spots der Reihe 4 Membran A in unterschiedlichen Bindungspuffern

In wiederholten Messungen wurde die Reproduzierbarkeit der Werte im Bezug auf verschiedene Experimente, die Herstellung des Bildmaterials für die Auswertung und die Auswertungsmethodik selbst untersucht.

Dabei ergab sich für die Auswertung unterschiedlicher Nullwertmessungen im gleichen Puffer bei schwach gefärbten Spots eine gemittelte Abweichung der normierten Werte von bis zu 2%, bei stärker gefärbten bis 5%. Mehrfache Auswertung des gleichen Bildmaterials ergab eine durchschnittliche Abweichung von 0,5%. Getestet wurde auch der Effekt verschiedener Kontrast- und Helligkeitseinstellung beim Scanvorgang. Hier ergab sich jedoch keine gesteigerte Abweichung im Vergleich zur doppelten Auswertung gleichen Bildmaterials.

Ein Signal, das durch die Bindung eines Oligonukleotids und nachfolgend durch die Detektion des gebundenen Biotins entsteht, sollte daher Effekt als 5% aufweisen, um als Bindung eines Oligonukleotids angesehen zu werden.

Die Bindung der beiden Oligonukleotide wurden im oben erwähnten Tris-Puffer mit 100mM NaCl ausgeführt. Zunächst wurde die Bindung in 7ml einer 2µM Lösung BioDickAT durchgeführt, diese resultierte jedoch nur in schwacher Färbung (Abbildung 3.25).

Nach der Beladung der Membran A mit Jeffamin-500 (siehe 2.6.1.1) wurde eine Bestimmung der Bedeckung des Filters mit reaktiven NH<sub>2</sub>-Gruppen ausgeführt. Dabei ergab sich eine Menge von 12,6nmol NH<sub>2</sub>-Gruppen pro Spot. Bei einer angenommenen

Kopplungsausbeute bei der Synthese für die gesamte Länge des Peptids von 90% ergibt sich eine Menge von  $4,8\mu\text{mol}$  Peptid (etwa  $3 \cdot 10^{18}$  Peptide für die gesamte Membran,  $7 \cdot 10^{15}$  pro Spot). Angeboten wurde  $14\text{nmol}$  Oligonukleotid ( $8 \cdot 10^{15}$  Teilchen). Daher kann bei maximaler Ausbeute jedes 343. Peptid ein Oligonukleotid binden.

Eine Erhöhung der Oligonukleotidmenge auf  $7\text{ml}$  einer  $12,25\mu\text{M}$  Lösung ( $85,8\text{nmol}$ ,  $5 \cdot 10^{16}$  Oligonukleotide, Belegung jedes 53. Peptids möglich) resultierte jedoch in keiner deutlichen Steigerung der Färbung. Abbildung 3.25 vergleicht die Reaktionen.

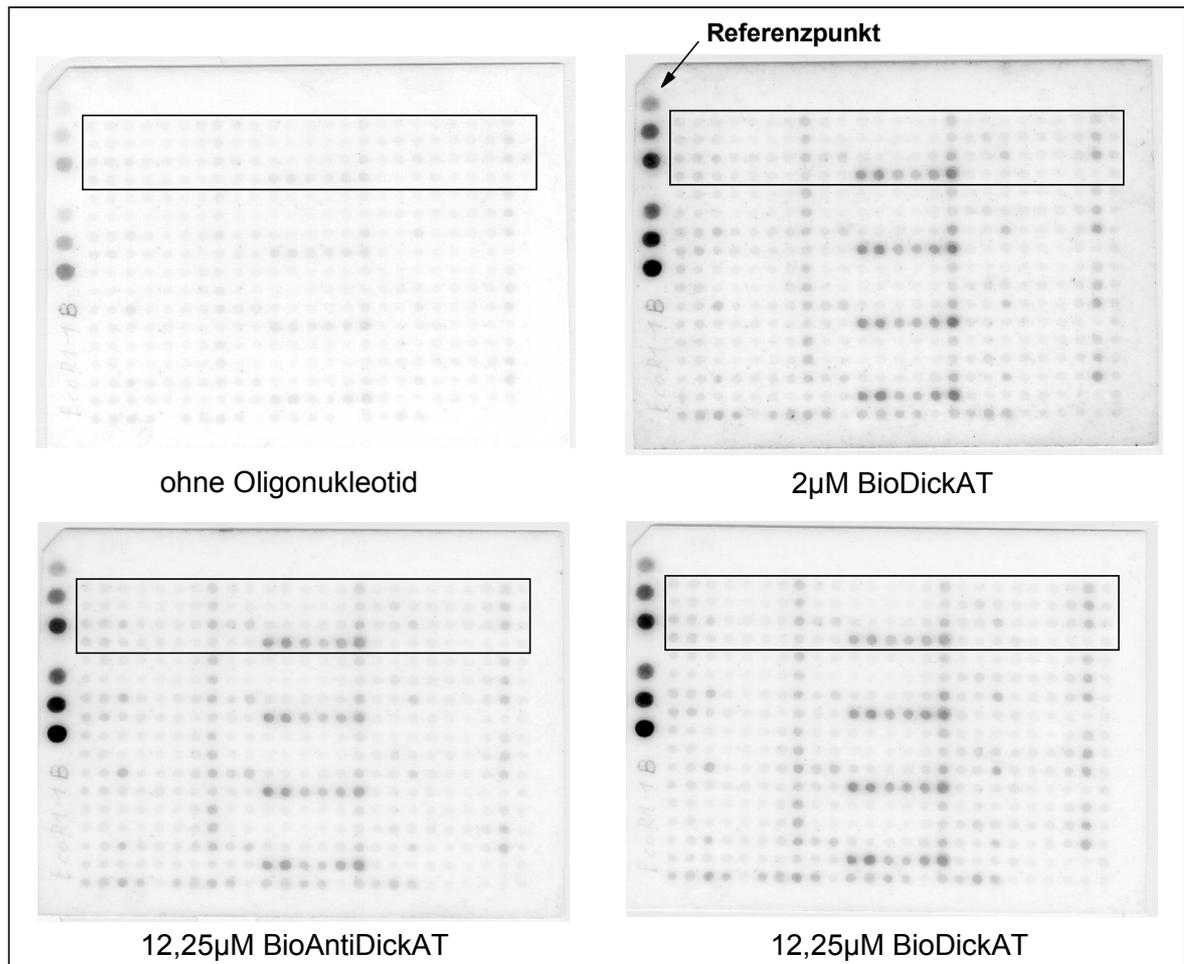


Abb. 3.25: Farbreaktionen der Membran A nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentration von BioDickAT oder BioAntiDickAT im Bindungspuffer. Der Kasten umschließt die Spots, deren Auswertungen in Abbildung 3.26 dargestellt sind.

Der Vergleich der beiden Färbungen zwischen der hohen und der niedrigen Oligonukleotidmenge von BioDickAT zeigt, daß keine Steigerung in der Bindung möglich ist. Die beiden Färbungen unterscheiden sich nicht untereinander und auch nicht signifikant von der Bindung des unspezifischen Oligonukleotids BioAntiDickAT. In Abbildung 3.26 sind die normierten Zahlenwerte für die hohen Oligonukleotidmengen der Reihen 1-4 aus Abbildung 3.25 dargestellt.

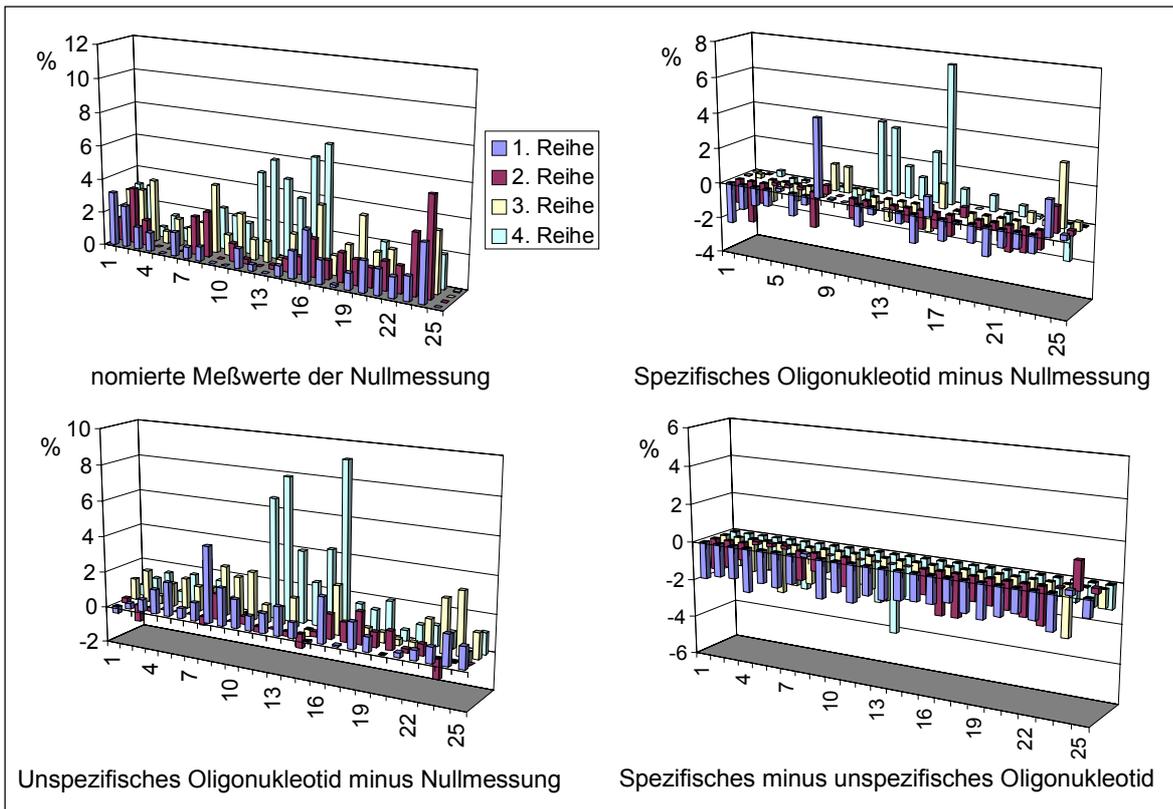


Abb. 3.26: Auswertung der Farbreaktionen der Spots in den Kästen aus Abbildung 3.25 normiert auf den Referenzpunkt (100%)

Die normierten Werte der ausgewählten Reihen für die Messung ohne Zusatz von Oligonukleotid (Nullmessung) sind in Abbildung 3.26 oben links dargestellt. Sie beziehen sich auf den Referenzpunkt mit einem festgelegten Wert von 100% (vergleiche Abbildung 3.25). Dargestellt sind außerdem die Werte, die sich nach der Normierung in der Differenz der Messungen mit Oligonukleotid von der Nullmessung ergaben.

Alle Werte für die Messungen in Gegenwart von Oligonukleotid waren insgesamt sehr klein. Einige Spots zeigten jedoch eine deutlich stärkere Färbung in Gegenwart von Oligonukleotid als in der Nullmessung. Im Vergleich zwischen spezifischem und unspezifischem Oligonukleotid aber zeigte sich, daß bis auf wenige Ausnahmen die Differenzen negativ waren und (Abbildung 3.26 unten rechts) innerhalb der Schwankungsbreite des Systems von 5% lagen. Es konnte daher keine spezifische Bindung des Oligonukleotids BioDickAT festgestellt werden.

In einem nachfolgenden Experiment wurde im Bindungspuffer 4 (200mM NaCl) die Nullmessung und die Bindung der Oligonukleotide wiederholt. Auch hier zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen der spezifischen und unspezifischen Bindung.

Durch den Zusatz unspezifischer DNA kann die Bindung des spezifischen Oligonukleotids unterstützt werden. Hierzu wurde Heringssperma-DNA durch Ultraschall degradiert und anschließend mit *EcoRI* geschnitten, um die spezifischen Erkennungssequenzen zu zerstören. Diese DNA wurde zum Bindungspuffer hinzugefügt (etwa 50facher molarer Überschuß bezogen auf das Oligonukleotid) und mit der Membran

inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion ausgeführt (Nullmessung) oder das Oligonukleotid der Lösung zugesetzt, für weitere zwei Stunden inkubiert und dann gefärbt. Nach der Auswertung der Farbreaktionen konnte keine verstärkte Bindung des spezifischen Oligonukleotids im Vergleich zum unspezifischen festgestellt werden, die außerhalb der Schwankungsbreite des Systems lag.

Es ist wahrscheinlich, daß die geringe Bindungsstärke der Peptide für die Oligonukleotide durch den bidentaten Ansatz nicht so sehr verbessert wurde, daß eine Detektion nach einer Inkubation mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat von 90 Minuten und den vier erforderlichen Waschschritten von jeweils zehn Minuten (siehe 2.6.1.2) möglich war. Während der Inkubation mit den Lösungen muß mit einer Abdissoziation des Oligonukleotids gerechnet werden. Um diese Schritte so weit wie möglich zu verkürzen, wurde eine Vorinkubation von Konjugat und Oligonukleotid vorgenommen. Dabei bildet sich die stabile Streptavidin-Biotin-Bindung aus, die eine genügend hohe Bindungskonstante aufweist, um die Inkubation unverändert zu überstehen. Beides wurde anschließend mit der Membran über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Außerdem wurden die Waschschriffe auf zweimal fünf Minuten reduziert. Auch hier ergab sich keine signifikante Erhöhung der normierten Meßwerte bei der Reaktion mit dem spezifischen Oligonukleotid im Vergleich zum unspezifischen.

Durch die Bindung eines Oligonukleotids war durchaus eine Erhöhung der Farbreaktion detektierbar. Sie war jedoch für das unspezifische Oligonukleotid in gleicher Weise vorhanden, so daß es sich bei der Bindung um eine unspezifische Attraktion handelt.

Aufgrund des Auftretens kleiner, stark gefärbter Punkte außerhalb der *Spots*, die sich auf dem Filter verteilen, war eine Auswertung durch *Scanner* und Software nicht möglich. Diese Artefakte zeigen an, daß die Reproduzierbarkeit der Meßwerte durch häufige Färbung und Entfärbung des Filters (Ultraschallbad in DMF, siehe 2.6.1.2) nicht mehr gegeben war. Insgesamt wurden mehr als 25 Reaktionen mit der Membran A ausgeführt.

### 3.3.1.2 Membran B

Die Bindungsexperimente mit der Membran A haben gezeigt, daß es sich überwiegend um unspezifische Bindung der Oligonukleotide an die Peptide handelt. Es wurden hauptsächlich Mutationen getestet, die eine Schwächung der DNA-Bindung hervorrufen, da von einer starken Bindung durch die *wt*-Sequenz ausgegangen wurde.

Damit die DNA zwischen die Peptidarme gelangen kann, müssen sie sich öffnen. Um diese zu erleichtern und mehr Flexibilität in den Armen zu erreichen, wurden die Positionen His147 (Abstand 5,1Å) und Lys148 (Abstand 10,9Å) gewählt, die einen ähnlich nahen Abstand wie Arg145 aufweisen. Durch das Einführen zusätzlicher positiver Ladung ist unter Umständen die Attraktion der DNA zwischen die Peptidarme

eher gewährleistet. In Verbindung mit den verschiedenen *Linkern* ergibt sich so eine vergrößerte Variationsbreite, die zu einer verbesserten Bindung der doppelsträngigen Oligonukleotide führen könnte. Für jede *Linker*/Anfang-Kombination ergibt sich eine Anzahl von 4x8 Peptiden. Die Belegung der Membran B ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

	Längen <b>Arg145</b> -Met137 bis <b>Arg145</b> -Lys130								Längen <b>His147</b> -Met137 bis <b>His147</b> -Lys130							Längen <b>Lys148</b> -Met137 bis <b>Lys148</b> -Lys130												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2		2	2	2	2	2
1	wt; 137-130																						B I O T I N I S P O T S					
DAP 2	<b>Glu</b> 144Gln; 137-130								Sequenzen wie Arg145/Kopf a							Sequenzen wie Arg145/Kopf a												
C1 3	①	<b>Asp</b> 135Lys (135-130)																										
4	②	③																										
5																												
DAB 6	Sequenzen wie Arg145/Kopf a								Sequenzen wie Arg145/Kopf a							Sequenzen wie Arg145/Kopf a												
C2 7																												
8																												
9																												
Om. 10	Sequenzen wie Arg145/Kopf a								Sequenzen wie Arg145/Kopf a							Sequenzen wie Arg145/Kopf a												
C3 11																												
12																												
13																												
Lys. 14	Sequenzen wie Arg145/Kopf a								Sequenzen wie Arg145/Kopf a							Sequenzen wie Arg145/Kopf a												
C4 15																												
16																												
17	Z U F A L L S P E P T I D E																											

Abb. 3.27: Belegung der Membran B; ① Asn141Tyr (137, 136), ② **Glu**144Gln/Asn141Tyr (137, 136), ③ **Glu**144Gln/**Asp**135Lys(135-130); basische Aminosäuren sind *kursiv*, saure **fett** dargestellt.

Eine negative Ladung, die DNA abstößt, wird unter anderem durch die Aminosäure Glu144 eingebracht, die Arg145 über eine Salzbrücke kontaktiert. Glutamin, das diese Ladung nicht trägt, sollte ebenfalls in der Lage sein, mit Arg145 einen Kontakt zu bilden und somit die Peptidarme auszurichten. Diese Proteinvariante besitzt eine Aktivität von  $4,4 \cdot 10^4$  U/mg und ist somit nur um den Faktor 100 langsamer als das wt-Enzym [Wolfes *et al.*, 1986].

Um einen Vergleich zwischen den Messungen der Membran A mit B zu ermöglichen, müssen einige Sequenzen wieder aufgenommen werden. Durch ihre ausgeprägte Interaktion mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat wurden die *Spots* mit

der Mutation Asp135Lys (Reihe 4, Gruppe 2 auf der Membran A) und Asn141Tyr (Reihe 2, Gruppe 3 auf Membran A) gewählt (vergleiche auch Abbildung 3.27). Die Gestaltung der Zufallspeptide erfolgte analog zur ersten Membran.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu erhalten, wurden die Biotin-Referenzpunkte in das Raster mit aufgenommen. Es handelt sich dabei um eine Verdünnungsreihe von acht Punkten mit Konzentrationen von 200mM bis 1,4mM, die doppelt aufgetragen wurde.

Die Experimente wurden im Tris-Bindungspuffer (100mM NaCl) ausgeführt. Sowohl die Nullmessung als auch die Messungen mit den Oligonukleotiden wurden durch eine Doppelbestimmung gesichert. Abbildung 3.28 stellt die Farbreaktionen dar. Dabei sind die Sequenzen der Peptide innerhalb eines Kastens gleich.

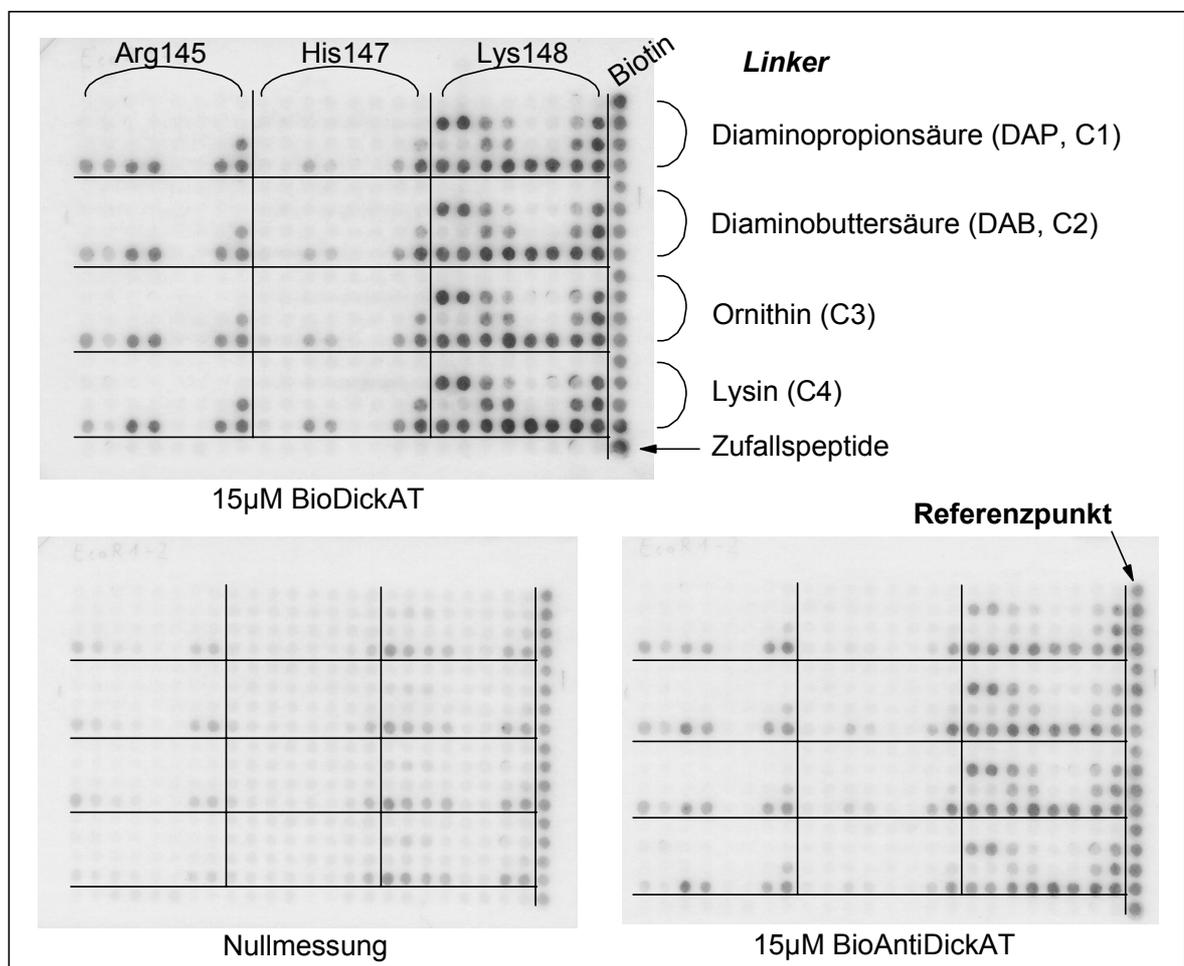


Abb. 3.28: Farbreaktionen der Membran B im Tris-Bindungspuffer (100mM NaCl) mit und ohne Oligonukleotid

Auffällig ist, daß die Biotin-Referenzpunkte in keiner der drei dargestellten Farbreaktionen Unterschiede in der Färbung erkennen lassen. In Abbildung 3.29 sind die Verhältnisse der Farbintensitäten der Biotin-Spots zum Referenzpunkt in verschiedenen Messungen dargestellt.

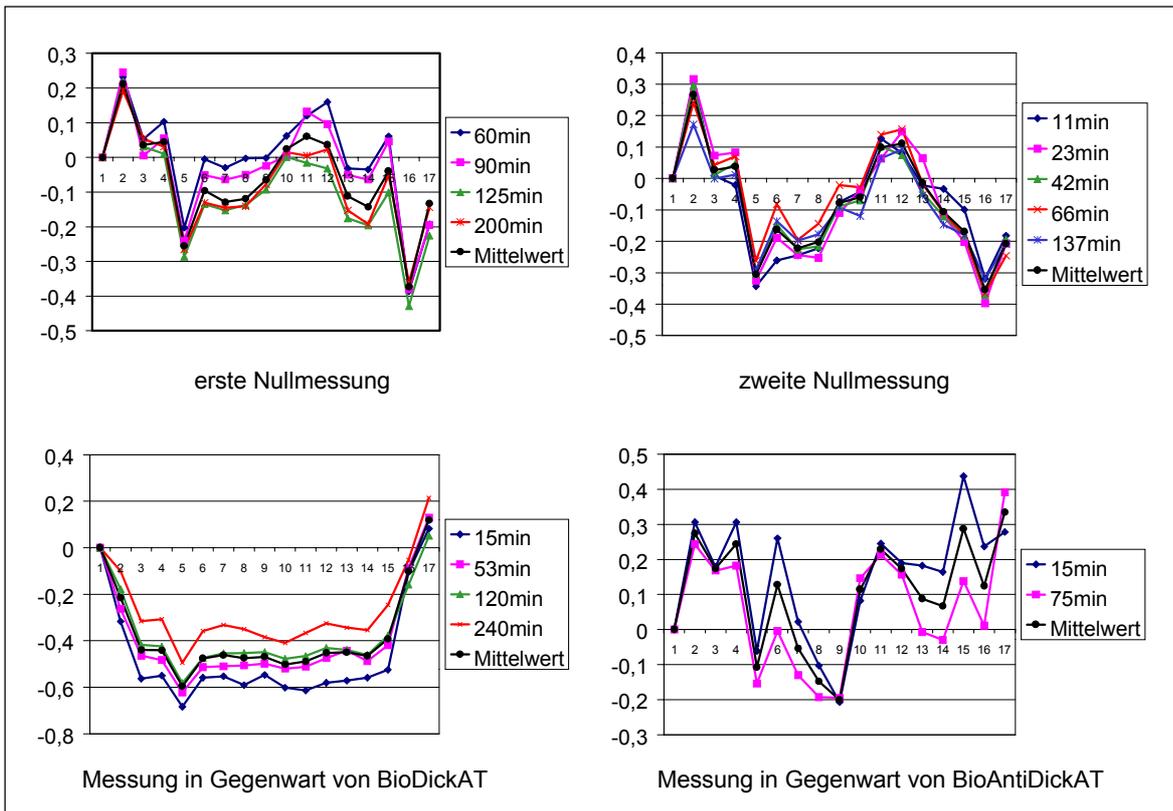


Abb. 3.29: Verhältnisse der Farbintensitäten der Biotin-Spots zum Referenzpunkt innerhalb einer Messung und zwischen unterschiedlichen Messungen

Innerhalb einer Messung (mehrere Zeitwerte der gleichen Färbung dargestellt durch unterschiedliche Farben der Graphik) ergaben sich ein konstante Verhältnisse zwischen den einzelnen Punkten, auch wenn diese nicht der aufgetragenen Konzentrationsreihe entsprachen. Die schwarze Kurve stellt jeweils den Mittelwert dar. Dies gilt auch für den Vergleich der Verhältnisse einzelner Peptidspots zum Referenzpunkt 25/1, die innerhalb einer Messung in einem engen Bereich liegen (nicht dargestellt).

Die Verhältnisse variieren jedoch zwischen verschiedenen Experimenten (*Stripping* und erneutes Färben). Die beiden oberen Graphiken in Abbildung 3.29 stellen die Nullwertbestimmungen dar. Die Kurvenverläufe sind für beide Experimente ähnlich, doch zeigen sich für einzelne Spots Abweichungen (zum Beispiel Spot 15). Es ist deutlich zu erkennen, daß der Zusatz von Oligonukleotid (untere Graphiken) eine Veränderung der Kurven bedingt. Auch hier sind die Messungen innerhalb eines Experiments in ihren Verhältnissen von der Zeit wenig abhängig. Zwischen BioDickAT (unten links) und BioAntiDickAT (unten rechts) ergibt sich jedoch keinerlei Ähnlichkeit mehr zwischen den Kurven.

Daraus ist zu schließen, daß die Färbung der Biotin-Referenzpunkte von der Anwesenheit der Oligonukleotide in der Lösung abhängt. Vor der eigentlichen Farbreaktion wurden durch mehrere Waschschrte die überschüssigen Oligonukleotidmoleküle entfernt, so daß anzunehmen ist, daß sie eine gewisse Affinität zu den Referenzpunkten aufweisen müssen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist keine Normierung auf die Biotin-Referenzreihe

möglich, da ihre Färbung von den Reaktionsbedingungen abhängt. Es sind daher nur qualitative Aussagen über die DNA-Bindung der Peptide möglich.

Zwischen den verschiedenen *Linkern* ergibt sich auch bei der Membran B kein Unterschied. Die auftretenden Färbungen bilden ein Muster, das alle vier Reihen wiederkehrt. Allerdings sind die Farbintensitäten der *Spots* von der Position der Verzweigung der Peptidarme abhängig.

Bei der Verzweigungsstelle Arg145 ist auffällig, daß Sequenzen, die auf der Membran A anfärbbar waren, hier kein Signal mehr ergeben. Färbung zeigt sich nur an sieben *Spots*, die allerdings neben der Mutation Asp135Lys, die auf der ersten Membran eine starke Färbung erzeugte, zusätzlich die Mutation Glu144Gln tragen. Durch die Entfernung der negativen Ladung ergibt sich eine stärkere Attraktion der Oligonukleotide an das Peptid.

Von den *Spots* mit Peptidanzug bei His147 sind nur fünf von nennenswerter Färbung, sie entsprechen den am stärksten gefärbten *Spots* der Arg145-Peptide. Die zusätzlichen Aminosäuren Histidin und Serin haben keinen Effekt auf die DNA-Bindung, so daß wahrscheinlich ist, daß das Histidin unter den gewählten Bedingungen nicht protoniert ist.

Die meisten Signale ergeben sich beim Peptidverzweigungspunkt Lys148. Auch hier ist der Austausch Glu144Gln ein entscheidender Faktor für die DNA-Attraktion (Reihen 2 und 4). Während die wt-Sequenz für alle *Linker* und Peptidverzweigungspunkte (Reihen 1, 5, 9 und 13) keine Bindung zeigt, ist bei dieser Verzweigung beim Austausch Glu144Gln eine starke Färbung zu erkennen (Reihe 2). Dabei ist die Intensität der Färbung von der Länge des Peptids abhängig. Während die Peptide der Länge bis Met137 und Leu136 (*Spots* 17/2 und 18/2) noch eine starke Färbung zeigen, nimmt diese ab der Aminosäure Asp135 ab. In der korrespondierenden Reihe 4, in der Asp135 durch Lysin ersetzt ist, ist die Färbung wesentlich stärker. In der Reihe 2 nimmt die Färbung für die wt-Sequenz mit Glu144Gln erst dann wieder signifikant zu, wenn Lysin am Ende steht (*Spot* 24/2). Analoge Betrachtungen gelten für die Färbungen der Reihen 3 und 4. Reihe 4 trägt neben den Sequenzen der Reihe 3 ebenfalls die Mutation Glu144Gln, was zu einer Verstärkung der DNA-Bindung führt.

Bei der Bindung durch die Peptide handelt es sich um eine unspezifische Attraktion der DNA. Die Werte für die Bindung von spezifischem und unspezifischem Oligonukleotid zeigen das gleiche Muster, und sind beim unspezifischen BioAntiDickAT sogar noch ausgeprägter. Es ist anhand der Sequenzen der Peptide deutlich zu erkennen, daß die Nettoladung eine große Rolle spielt: Beim Austausch von Glutamat, das eine negative Ladung trägt, gegen das ungeladene Glutamin wird eine unvorteilhafte Abstoßung zwischen Peptid und DNA entfernt. In analoger Weise sind die Enden der Peptide zu betrachten. Sie schließen überwiegend mit einer basischen Aminosäure (Lysin und Arginin) ab, die eine positive Ladung mitbringen. Durch den Verzweigungspunkt der

Peptide bei Lys148 werden zusätzliche positive Ladungen eingebracht, die vorteilhaft für eine DNA-Bindung sind. Die Peptide mit dem Beginn an His147 zeigten keine ausgeprägte DNA-Bindung. Im Vergleich zu den Peptiden bei Arg145 ist Ser146 und His147 hinzugekommen. Möglicherweise ist das Histidin unter den verwendeten Pufferbedingungen ungeladen, und kann nicht zur DNA-Attraktion beitragen.

Wie in dem Experiment mit der Membran A wurde der Zusatz von unspezifischer DNA (Überschuß etwa 50fach) bei der Inkubation getestet. In analoger Weise wurde das Verhältnis der Biotin-*Spots* zueinander innerhalb eines Experiments und zwischen den Experimenten analysiert. Auch hier zeigte sich eine Varianz zwischen den Kurven, die durch den Zusatz der Oligonukleotide hervorgerufen wurde. Der Zusatz unspezifischer DNA brachte keinen Ausgleich zwischen den Messungen. So ist auch hier nur eine qualitative Auswertung der DNA-Bindung möglich.

Nach der Farbreaktion konnten keine Unterschiede in den Mustern detektiert werden. Die Färbung der *Spots* in Gegenwart unspezifischer DNA war wesentlich schwächer als ohne. Dies war bereits an den Biotin-Referenzpunkten zu sehen. Das generelle Muster war jedoch identisch.

Auf weitere Versuche mit der Peptidbibliothek wurde verzichtet, da durch die fehlende Referenz zwischen den Experimenten kein quantitativer Vergleich möglich war. Qualitativ läßt sich zusammenfassend sagen, daß die Bindung der Peptide offenbar rein unspezifischer Natur ist. Die Bindung von Oligonukleotiden ist detektierbar, allerdings nicht von ihrer Basensequenz abhängig. Die Länge der Peptide spielt nur insofern eine Rolle, als daß die längeren Moleküle aufgrund der Sequenz des *Extended chain*-Motivs mehr positive Ladungen tragen, und so für eine stärkere unspezifische Attraktion der DNA sorgen. Einen Unterschied in den Verknüpfungspunkten ergibt sich nur durch die Tatsache, daß der Beginn bei Lys148 weitere positive Ladungen einführt.

Durch die geringen Bindungskonstanten der Oligonukleotide an die Peptide in diesem Zwei-Phasen-System konnte keine ausreichende Farbreaktion erreicht werden, da durch die Waschschrte die Oligonukleotide weitestgehend entfernt wurden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden ausgewählte Sequenzen als freie Peptide synthetisiert. In der flüssigen Phase entsteht ein Gleichgewicht zwischen Peptid und DNA, das detektiert werden kann. Analog zu den Experimenten von Jeltsch *et al.* (1995) kann die Bindung des Peptids durch eine Hemmung der Spaltung durch die Restriktionsendonuklease *EcoRI* und andere Enzyme nachgewiesen und die DNA-Bindungskonstante bestimmt werden.

### 3.3.2 Bindungsexperimente freier Peptide an Plasmid-DNA

Der größte Vorteil einer Peptidbibliothek, wie sie eine Zellulosemembran darstellt, ist die Anzahl der Peptide, die zeitgleich in einem Experiment untersucht werden können. Bei der Untersuchung freier Peptide muß eine Beschränkung auf eine noch handhabbare Anzahl von Sequenzen erfolgen, da es sich um getrennte Experimente handelt.

Aufgrund der Synthesegenauigkeit werden die Peptide beschränkt auf eine Länge bis Aminosäure Met137. Die Aminosäuren 130 bis 136 bewirkten nur durch die positiv geladenen Aminosäuren eine zusätzliche Attraktion der DNA, sollten jedoch für die Spezifität wenig maßgeblich sein, da die Majorität der Kontakte von den Aminosäuren 137 bis 145 ausgebildet wird (vergleiche Abbildung 3.19).

Im Zwei-Phasen-System erschien die Art der Verknüpfung nicht erheblich. Daher wurden für die freien Peptide nur zwei der vier *Linker* ausgewählt, Diaminopropionsäure (DAP, C1) und Lysin (C4). Unterschiede ergaben sich jedoch in der Position der Verzweigung zum bidentaten Peptid, so daß keiner der drei Verzweigungspunkte ausgeschlossen werden konnte. Es wurden zunächst folgende Peptide synthetisiert (für die Sequenz siehe Tabelle 2.11 und Abbildung 3.33):

- Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub>: Nach dem *Linker* DAP (C1) beziehungsweise Lysin (C4) beginnen die Peptide an der Aminosäure Arg145 und enthalten die wt-Sequenz des *Extended chain*-Motivs bis Met137.
- His147<sub>C1</sub> und His147<sub>C4</sub>: Analog im Aufbau zu den obigen Peptiden beginnen sie bei Aminosäure His147.
- Lys148<sub>C1</sub> und Lys148<sub>C4</sub>: Analog im Aufbau zu den obigen Peptiden beginnen sie bei Aminosäure Lys148.

In Anlehnung an die Experimente, die bei Jeltsch *et al.* (1995) beschrieben sind, wurden die Peptide verwendet, um als Kompetitor an Plasmid-DNA zu binden und so eine Hemmung der Spaltung durch Restriktionsendonukleasen zu erreichen (siehe 2.6.2.2). Auf Plasmid-DNA sind die spezifischen Sequenzen, die vom Peptid erkannt werden können gegenüber den unspezifischen unterrepräsentiert.

Das Plasmid pACYC184 (4245bp) besitzt eine *EcoRI*-Schnittstelle. Sie überlappt mit einer der beiden *BspEI*-Schnittstellen (TCCGGA). Bei der Bindung eines *Extended chain*-Peptids sollte eine Spaltung durch *EcoRI* gehemmt werden, ebenso wie die *BspEI*-Spaltung an der überlappenden Erkennungssequenz, aber nicht der anderen (vergleiche Abbildung 3.31).

Zunächst wurde in einer Spaltkinetik die Hemmung der spezifischen Spaltung von *EcoRI* und *BspEI* durch alle Peptide im Vergleich zur ungehemmten Spaltung ermittelt. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 20µM, 100µM und 500µM eingesetzt. Dabei zeigte sich für beide Enzyme eine Hemmung in Gegenwart hoher Kon-

zentrationen der Peptide Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub>. Die Peptide mit den Verzweigungspunkten His147 und Lys148 zeigten unter diesen Bedingungen keinen Einfluß auf die Spaltung.

Die Peptide Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> wurden in höheren Konzentrationen der Spaltung zugesetzt. Abbildung 3.30 stellt exemplarisch die Spaltungen durch *EcoRI* in An- und Abwesenheit der Peptide in einer Konzentration gegenüber.

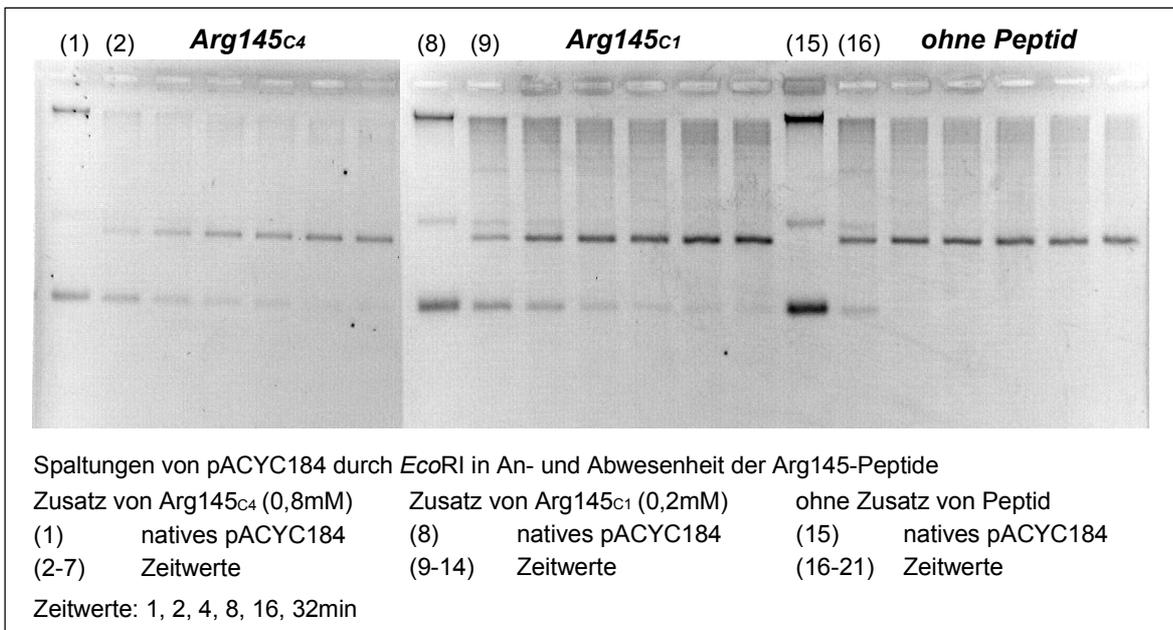


Abb. 3.30: Spaltkinetiken von pACYC184 durch *EcoRI* in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Arg145-Peptide

Die Spaltung war in Abwesenheit eines Peptids beim zweiten Zeitwert (2min) beendet. Durch den Zusatz von Arg145<sub>C1</sub> oder Arg145<sub>C4</sub> wird die Spaltung verlangsamt, so daß sie erst bei 32min beendet war. Die Konzentration von Arg145<sub>C4</sub> im Test war um den Faktor vier höher als jene von Arg145<sub>C1</sub>. Tabellen 3.14 faßt das Ausmaß der Hemmung in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration zusammen.

Tab. 3.14: Hemmungen der *EcoRI*-Spaltung von pACYC184 durch unterschiedliche Konzentrationen von Arg145<sub>C1</sub> oder Arg145<sub>C4</sub>

Konzentration [mM]	Faktor der Hemmung durch	
	Arg145 <sub>C1</sub>	Arg145 <sub>C4</sub>
0,05	4	
0,1	8	
0,2	16	2
0,4		8
0,8		16

Die Fragmentierung des Plasmids durch *BspEI* wurde in ähnlicher Weise gehemmt. Um eine Unterscheidung zwischen den beiden Restriktionsspaltstellen zu ermöglichen, wurde pACYC184 in linearisierter Form (gespalten durch *HindIII*) in das Experiment eingesetzt. Abbildung 3.31 zeigt schematisch die möglichen Fragmente der Spaltung zusammen mit der Hemmung durch die Anwesenheit von Arg145<sub>C1</sub>.

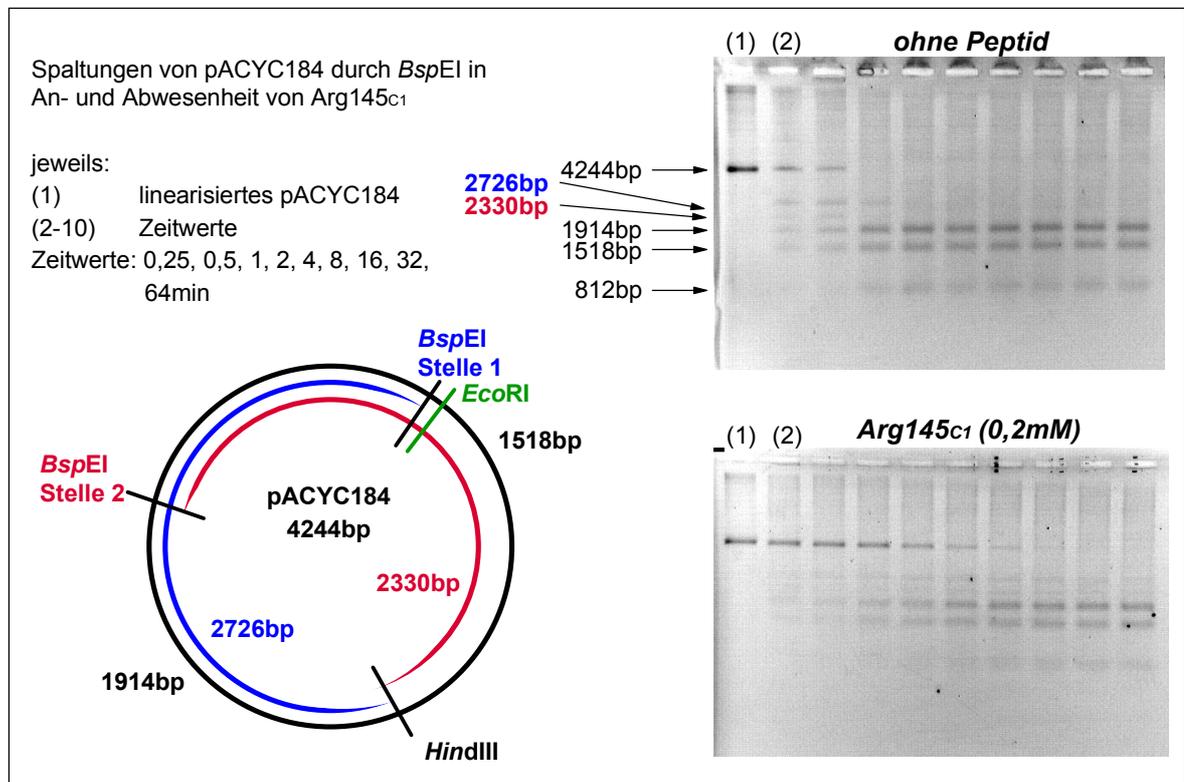


Abb. 3.31: Plasmidkarte von pACYC184 und Spaltungen durch *BspEI* in An- und Abwesenheit von Arg145<sub>C1</sub>

Bei der ungehemmten Spaltung durch *BspEI* bleibt das größere Fragment (2726bp, blau in der Darstellung) länger erhalten. Das Enzym bevorzugt daher die Spaltstelle 1, die mit der *EcoRI*-Erkennungssequenz überlappend ist. In der Spaltung mit Arg145<sub>C1</sub> (0,2mM) ist diese Bevorzugung aufgehoben. Dies kann durch die Bindung des Peptids an die *EcoRI*-Erkennungssequenz erklärt werden.

Für eine zusätzliche Bestimmung der spezifischen Bindungskonstante sind Bindungsexperimente mit Plasmid-DNA als Substrat nicht geeignet. Dazu werden *Single turn over*-Bedingungen benötigt, unter denen die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung ermittelt werden kann. Um eine genügend hohe Konzentration des Enzyms zur Verfügung zu haben, wurden die Experimente mit der Spaltung von Oligonukleotiden weitergeführt (siehe 3.3.3).

### 3.3.3 Bindungsexperimente freier Peptide an Oligonukleotide

Die Bestimmung der Bindungskonstante eines Peptids an die DNA kann durch Messungen der Spaltgeschwindigkeit eines Restriktionsenzym unter *Single turn over*-Bedingungen stattfinden, dessen Erkennungssequenz mit der Bindungsstelle des Peptid zumindest überlappt. Dabei wird das Enzym im Vergleich zur zu spaltenden DNA im Überschuß eingesetzt. Für die Messung wird ein doppelsträngiges, in einem Strang radioaktiv markiertes Oligonukleotid verwendet, das Spaltstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen enthält und somit erlaubt, die Sequenzspezifität des Peptids näher einzugrenzen (Abbildung 3.32).

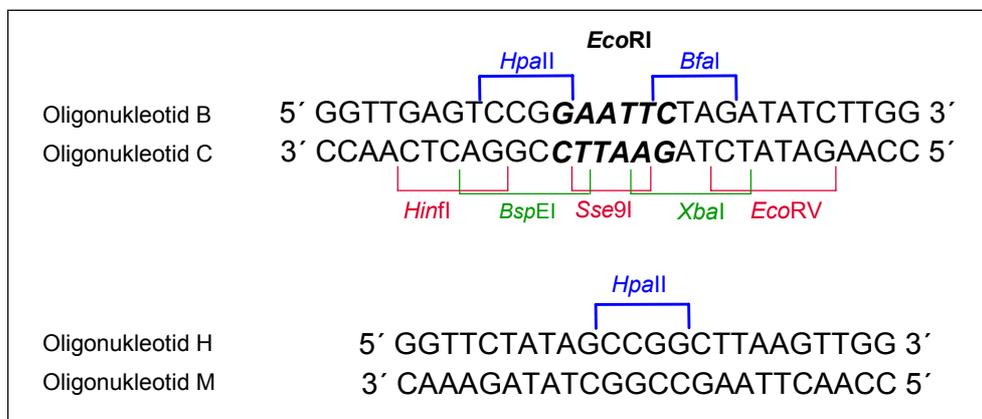


Abb. 3.32: Sequenzen und Restriktionsspalstellen der Oligonukleotide B/C und H/M

Als Voraussetzung für diese Kinetiken muß gelten, daß das Enzym in sehr kurzer Zeit (15s) alle zugänglichen Oligonukleotide spaltet. Die Zugabe einer definierten Menge Peptid bewirkt eine Konkurrenz mit dem Enzym um die Erkennungssequenz.

In Ergänzung zu den für die Hemmung der Spaltung von Plasmiden verwendeten Peptiden (siehe 3.3.2) wurden zusätzlich folgende Peptide hergestellt (für die Aminosäuresequenzen siehe Tabelle 2.11):

- Arg145<sub>mono</sub>: Zusätzlich zu den Peptiden Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> wurde das monodentate Peptid gleicher Sequenz hergestellt, um die Auswirkungen des *Linkers* zu untersuchen.
- Gruppe  $\alpha$ 4: In Analogie zu den Experimenten von Jeltsch *et al.* (1995b) wurde das Peptid  $\alpha$ 4 monodentat ( $\alpha$ 4<sub>mono</sub>) und bidentat mit den *Linkern* DAP ( $\alpha$ 4<sub>C1</sub>) und Lysin ( $\alpha$ 4<sub>C4</sub>) synthetisiert.
- Gruppe Ser143: Zur Erhöhung der Hydrophilie zwischen den Peptidarmen wurde die Aminosäure Ile143, die im DNA-Kokristall von *EcoRI* keinen Kontakt zur DNA ausbildet, durch Serin ersetzt. Diese Sequenz wurde monodentat (Ser143<sub>mono</sub>) und bidentat mit dem *Linker*

DAP (Ser143<sub>C1</sub>) synthetisiert.

- Gruppe Gly145: Um eine höhere Flexibilität der Peptidarme zu erreichen, wurden zwischen den *Linker* und das eigentliche *Extended chain*-Motiv drei Glycine eingefügt. Diese Sequenz wurde monodentat (Gly145<sub>mono</sub>) und bidentat mit dem *Linker* DAP (Gly145<sub>C1</sub>) synthetisiert.
- Gruppe Gly142: In Analogie zur Gruppe Gly145 wurden die drei Aminosäuren Arg145, Glu144 und Ile143 durch Glycine ersetzt, so daß das *Extended chain*-Motiv bis zur Aminosäure Ala142 verkürzt wurde. Dieses Sequenz wurde monodentat (Gly142<sub>mono</sub>) und bidentat mit dem *Linker* DAP (Gly142<sub>C1</sub>) synthetisiert.

Die Peptide  $\alpha$ 4<sub>mono</sub>, Ser143<sub>mono</sub>, Gly142<sub>mono</sub> und Gly145<sub>mono</sub> tragen am Ende ihrer Sequenz ein Lysin, das einem Synthesefehler entstammt.

Abbildung 3.33 zeigt ein Schema der modifizierten Peptide und hebt die Unterschiede zur Referenzgruppe Arg145 hervor.

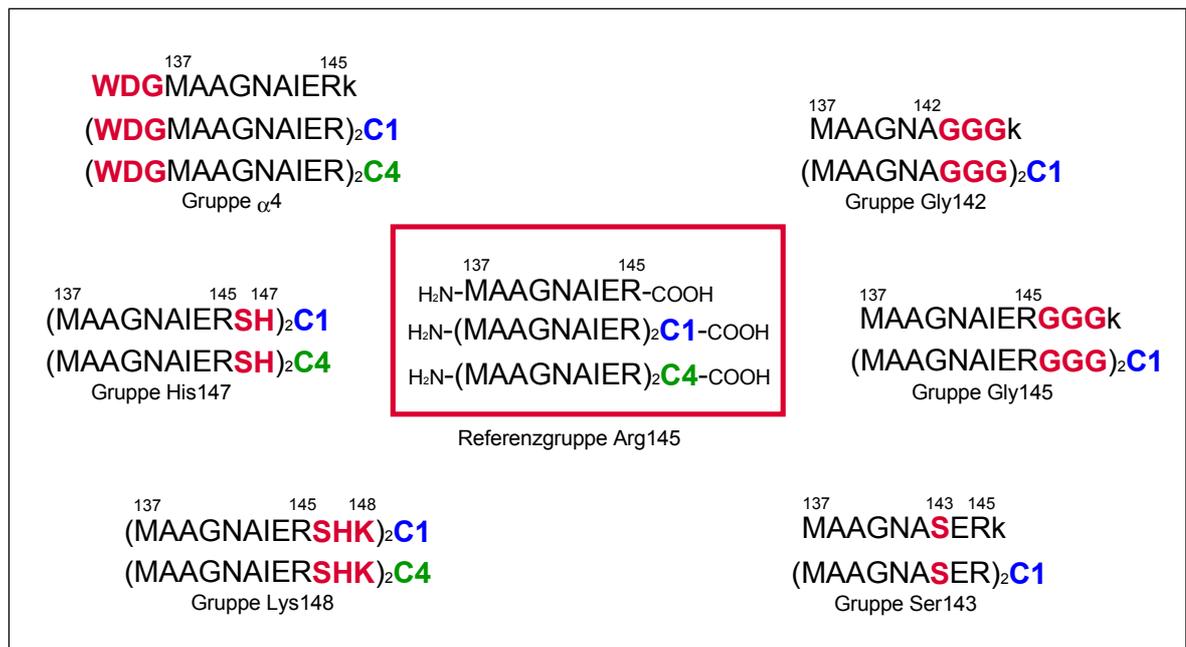


Abb. 3.33: Übersicht über die Gruppen von Peptiden im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145

Für die Experimente wurden zunächst Peptid und DNA bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms zur Reaktionslösung gestartet. Es kann nur diejenigen Oligonukleotide spalten, die nicht durch ein Peptid belegt sind. Daher trat eine Hemmung der Spaltung auf, die von der Konzentration des Peptids abhängt. In aufeinanderfolgenden Experimenten wurden mit der gleichen Enzymverdünnung steigende Konzentrationen Peptid dem Oligonukleotid zugesetzt. Abbildung 3.34 zeigt den typischen Verlauf eines solchen Experiments für *EcoRI* und *EcoRV* mit Arg145<sub>C1</sub> unter Zusatz von 5  $\mu$ M poly-dIdC.

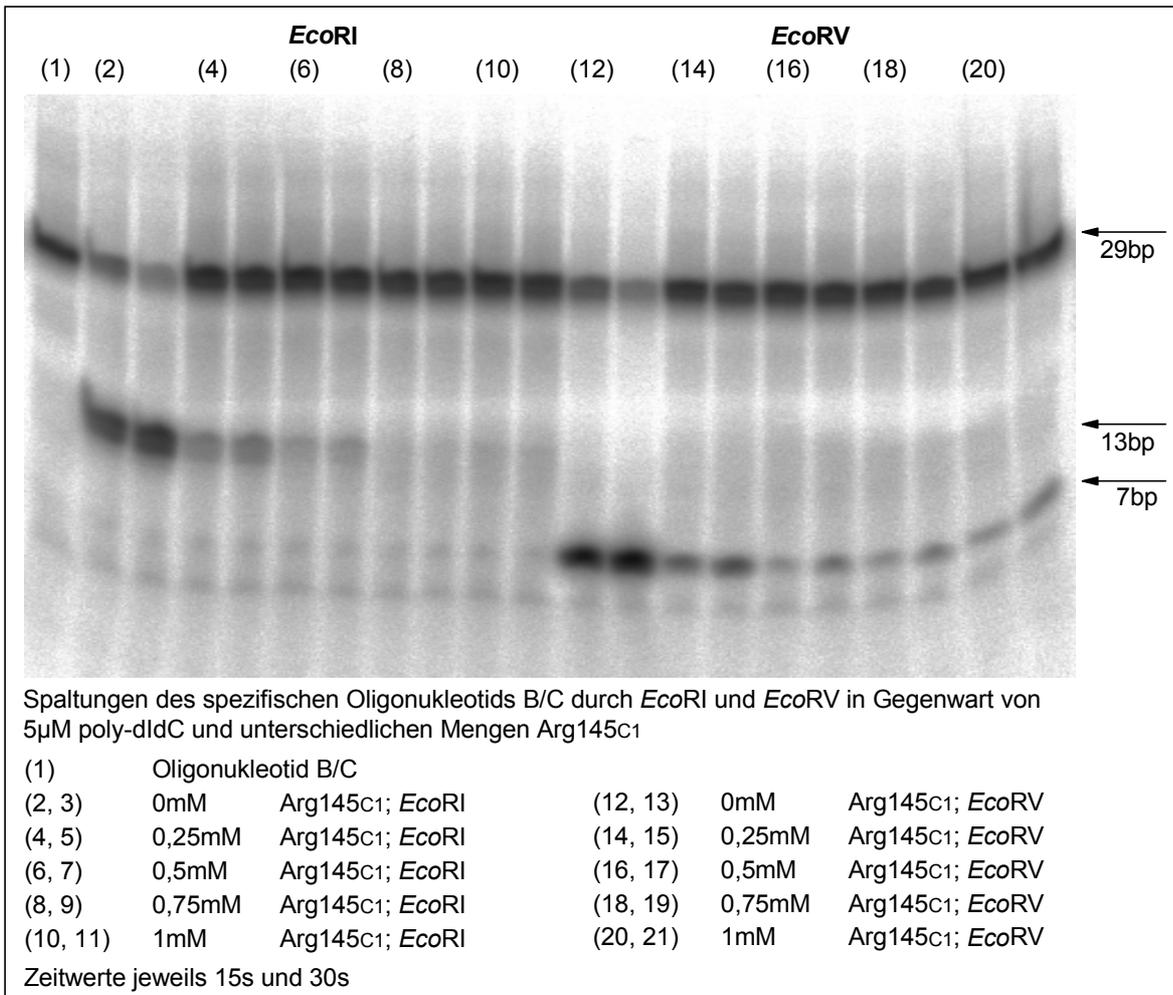


Abb. 3.34: Kinetiken von *EcoRI* und *EcoRV* mit dem Oligonukleotid B/C in Gegenwart von 5μM poly-dIdC und unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids Arg145c1

Die oberen Banden auf dem Gel entstehen durch das nicht gespaltene Oligonukleotid (29bp). Es ist deutlich zu sehen, daß ohne den Zusatz von Peptid ein großer Prozentsatz des Oligonukleotids gespaltene wurde. Zwischen den beiden Zeitwerten tritt nur noch eine leichte Steigerung der Produktmenge auf. Die Spaltprodukte (13bp für *EcoRI* und 7bp für *EcoRV*) sind gut vom Edukt zu unterscheiden. Für jeden Datensatz, aus dem die Bindungskonstante ermittelt wurde, wurden mindestens fünf Peptidkonzentrationen eingesetzt.

Die Spaltungen wurden mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid ausgeführt, so daß die Dokumentation der Spaltungen durch das Phosphoimager-System (Fuji) möglich war. Mithilfe einer Auswertungssoftware konnte die Intensität der Banden im Vergleich zum Hintergrund ermittelt werden, die in eine prozentuale Spaltung für jede Peptidkonzentration und jeden Zeitwert umgerechnet wurde. Aus der Hemmung der Spaltung mit wachsender Peptidkonzentration konnte durch ein iteratives Verfahren die Bindungskonstante des Peptids an die DNA-Sequenz errechnet werden, indem auf die Spaltgeschwindigkeit ohne Zusatz von Peptid bezogen wurde. Diese Vorgehensweise wurde durch mehrfaches Überprüfen in seiner Richtigkeit bestätigt: Aus einer Enzymverdünnung kann in guter Reproduzierbarkeit die gleiche Spaltung er-

reicht werden.

Abbildung 3.35 zeigt den Verlauf der Abnahme der Spaltung für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* aus den Werten, die aus Abbildung 3.34 ermittelt wurden. Dargestellt sind ebenfalls die theoretischen Kurven für die ermittelte Bindungskonstante (hier  $2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ ).

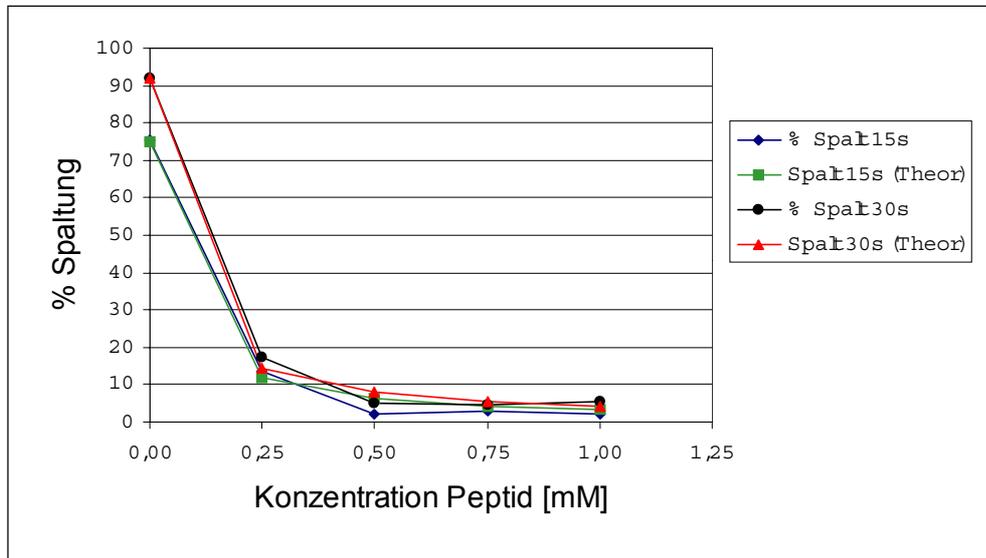


Abb. 3.35: Anpassung der Meßwerte zur Abnahme der prozentualen Spaltung durch *EcoRV* aus Abbildung 3.34

Die Ermittlung der Bindungskonstante aus einem solchen Kurvenverlauf ist stark vom ersten Meßwert mit Peptidzusatz abhängig. Durch Mehrfachbestimmungen wurde diese Unsicherheit in den Bindungskonstanten relativiert.

Durch die Grenzen in der Detektion der Spaltprodukte und der Pipettiergenauigkeiten kann das hier beschriebene Meßsystem keine Bindungskonstanten bestimmen, die kleiner als  $10^2 \text{M}^{-1}$  betragen.

Neben den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV*, die als hochkonzentrierte Laborpräparationen vorlagen (Konzentration *EcoRI*:  $14,8 \mu\text{M}$ ; *EcoRV*:  $13,8 \mu\text{M}$ ), wurden die Spaltexperimente mit den Enzymen *XbaI*, *BspEI*, *Hinfl*, *HpaII*, *BfaI* und *Sse9I* ausgeführt (vergleiche Abbildung 3.32). Dabei konnte jedoch mit den üblicherweise von den Herstellern angebotenen  $10\text{-}12 \text{U}/\mu\text{l}$  keine ausreichende Spaltung in hinreichend kurzer Zeit erreicht werden. *Hinfl*, *HpaII* und *XbaI* konnten mit  $50 \text{U}/\mu\text{l}$  erworben werden und wurden mit  $150 \text{U}/\text{Zeitwert}$  (*Hinfl*, *XbaI*) beziehungsweise  $100 \text{U}/\text{Zeitwert}$  (*HpaII*) eingesetzt. Da die Konzentrationen der Enzyme in diesen Lösungen nicht bekannt sind, war es jedoch nicht möglich, *Single turn over*-Bedingungen so genau einzustellen, wie es für *EcoRI* und *EcoRV* erfolgte. Allerdings führen diese Enzymkonzentrationen auch zu einer sehr guten Spaltung (bis 70%) in 15 Sekunden.

Alle Bindungskonstanten (Tabellen 3.15 bis 3.20) wurden durch Mehrfachbestimmungen ermittelt. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel der Messungen für die eine gute Anpassung erreicht werden konnte. Vor allem in Experimenten mit den Enzymen *Hinfl*, *XbaI* und *HpaII* traten häufig Schwierigkeiten durch eine zu kleine initiale Spaltung auf, daher konnten zum Teil nur Einfachbestimmungen erfolgreich ausgeführt werden. Die Tabellen beruhen auf einer Anzahl von fast 400 Reaktionsansätzen, von denen jede mindestens fünf Peptidkonzentrationen in zwei Meßwerten umfaßt. Durch die große Anzahl von Variationen im System ergeben sich noch einige Ungenauigkeiten, die aber das qualitative Bild nicht beeinträchtigen.

### 3.3.3.1 Bindung unmodifizierter Peptide an Oligonukleotide

Die Gruppen Arg145, His147 und Lys148 bestehen aus einer Aminosäuresequenz, wie sie in der *Extended chain* vorkommt. Sie unterscheiden sich nur in der Position des *Linkers*. Tabelle 3.15 faßt die ermittelten Bindungskonstanten zusammen.

Tab. 3.15: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die unmodifizierten Peptide (Gruppen Arg145, His147 und Lys148) an das Oligonukleotid B/C

Sequenz	Gruppe Arg145			Gruppe His147		Gruppe Lys148	
	mono	C1	C4	C1	C4	C1	C4
<b><i>EcoRI</i></b>	$<10^2$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	$1 \cdot 10^4$ ( $\pm 9 \cdot 10^3$ )	$1 \cdot 10^4$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 1 \cdot 10^4$ )	$2 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$<10^2$
<b><i>EcoRV</i></b>	$<10^2$	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^2$ )	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 2 \cdot 10^4$ )	$3 \cdot 10^4$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$<10^2$
<b><i>HpaII</i></b>	$1,3 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^2$ )	$6 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^3$ ( $\pm 8 \cdot 10^2$ )	$8 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )	/	/
<b><i>Hinfl</i></b>	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 1 \cdot 10^4$ )	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	/	/
<b><i>XbaI</i></b>	$<10^2$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 5 \cdot 10^2$ )	$4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^4$	/	/

#### Peptidgruppe Arg145

Die Bindung des Peptids Arg145<sub>mono</sub> ist für die *EcoRI*- und die *EcoRV*-Spaltstellen nicht detektierbar (bis zu einer Konzentration von 1,2mM Peptid in der Reaktionslösung). Analog wurde auch die *XbaI*-Spaltstelle, die sich zwischen den Sequenzen von *EcoRI* und *EcoRV* befindet (vergleiche Abbildung 3.32), von diesem Peptid nicht gebunden. Die Verknüpfung dieser Aminosäuresequenz zu einem bidentaten Peptid (Arg145<sub>C1</sub> oder Arg145<sub>C4</sub>) bewirkte eine Steigerung der Bindung für diese DNA-Sequenzen mindestens um den Faktor 100 auf etwa  $10^4 M^{-1}$ . Diese Steigerung war ebenfalls an den Erkennungssequenzen von *Hinfl* und *HpaII* detektierbar, wenn auch

nicht im gleichen Maße, da das Peptid Arg145<sub>mono</sub> an diese Sequenzen detektierbar gebunden hat.

Im Vergleich zwischen Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> zeigte sich eine generell etwas bessere Bindung für den *Linker* DAP (C1) an allen gemessenen Endonuklease-Spaltstellen. Es gab sich eine leichte Bevorzugung der bidentaten Peptide dieser Gruppe für die *EcoRI*-Spaltstelle im Vergleich zu *EcoRV*.

#### Peptidgruppe His147

Auffallend ist, daß die ermittelten Bindungskonstanten für beide Peptide dieser Gruppe für die Sequenzen von *EcoRI* und *EcoRV* annähernd gleich waren. Die Bindung von His147<sub>C1</sub> an den Sequenzen der Enzyme *HpaII*, *HinfI* und *XbaI* war etwas schlechter, während sie für His147<sub>C4</sub> für die Enzyme annähernd gleich sind. Dies kann bedeuten, daß es sich um eine gänzlich unspezifische Attraktion der DNA handelt, da keine sequenzabhängigen Unterschiede zu beobachten waren (vergleiche auch Tabelle 3.16).

Die ermittelten Werte für die Bindungskonstanten auf der *XbaI*-Spaltstelle wichen in diesem Fall von den Werten für jene von *EcoRI* und *EcoRV* ab, obwohl die Erkennungssequenz mit den beiden anderen Sequenzen überlappt.

Im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145 ergab sich kein großer Unterschied in der Bindungskonstante für die *EcoRI*-Erkennungssequenz, für den *Linker* DAP (C1) war sie etwas kleiner, für den *Linker* Lysin (C4) etwas größer. Auf der *EcoRV*-Sequenz ergibt sich für die Peptide beider *Linker* eine leicht verbesserte Bindung. Die zusätzlichen Aminosäuren Serin und Histidin der Gruppe His147 sind hydrophil und bewirkten so eine gesteigerte Löslichkeit im Vergleich zu Arg145 (vergleiche Tabelle 2.11). Sie liegen aber unter den Pufferbedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit ungeladen vor.

Der längere Lysin-*Linker* (C4) schien für die um zwei Aminosäuren längeren Peptide günstiger zu sein als das kürzere DAP (C1).

#### Peptidgruppe Lys148

Beide bidentaten Peptide zeigten eine Bindungskonstante an der Grenze der Meßbarkeit, für Lys148<sub>C1</sub> gerade noch meßbar, für Lys148<sub>C4</sub> nicht mehr ( $<10^2$ ). Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Bindungskonstanten der beiden Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *EcoRV*.

Im Vergleich zur Gruppe His147 sank die Bindungsfähigkeit der Peptide durch die Einführung einer weiteren Aminosäure (Lys148) bis auf einen gerade noch detektierbaren Level. Das eingeführte Lysin sollte zwar aufgrund seiner Ladung eine Attraktion an die DNA bewirken, die jedoch nicht festzustellen war. Der Abstand Lys148-Lys148 beträgt 10,91Å und ist damit doppelt so groß wie zwischen His147-His147. Durch die Verknüpfung an diesem Punkt könnte die korrekte Ausrichtung der Peptidarme gestört werden, so daß sie nicht mehr der Form der DNA folgen können, die für eine detek-

tierbare Bindung nötig wäre.

Der Vergleich der Bindungskonstanten innerhalb der Gruppe His147 zeigt, daß dieses Peptid keine Diskriminierung zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen vornimmt. Für eine gänzlich unspezifische Bindung sollte sich eine Bindungskonstante auf einem anderen Oligonukleotid ohne Erkennungssequenz in gleicher Höhe ergeben.

Die Vergleiche zwischen den Hemmungen der Enzyme haben gezeigt, daß die Peptide die Sequenzen GAATTC (*EcoRI*), GATATC (*EcoRV*) und GANTC (*Hinfl*) mit nahezu gleicher Effektivität binden. Daher sollte ein unspezifisches Oligonukleotid diese Sequenzen nicht enthalten. Weiterhin wurde das Enzym *HpaII* auf dem spezifischen Oligonukleotid B/C durch die Überlappung der Sequenz mit der *EcoRI*-Erkennungssequenz gehemmt, doch die Spaltstelle selbst sollte von den Peptiden nicht gebunden werden. Dies führte zum Design des Oligonukleotids H/M (siehe Abbildung 3.32).

Tabelle 3.16 stellt die Bindungskonstanten für die Gruppen Arg145 und His147 mit beiden Oligonukleotiden dar.

Tab. 3.16: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die Peptidgruppen Arg145 und His147 an das spezifische Oligonukleotid B/C im Vergleich zum unspezifischen Oligonukleotid H/M für die *HpaII*-Sequenz

Sequenz	Arg145 <sub>mono</sub>	Arg145 <sub>C1</sub>	Arg145 <sub>C4</sub>	His147 <sub>C1</sub>	His147 <sub>C4</sub>
<b><i>HpaII</i> spezifisch (B/C)</b>	$1,3 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^2$ )	$6 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^3$ ( $\pm 8 \cdot 10^2$ )	$8 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )
<b><i>HpaII</i> unspezifisch (H/M)</b>	$1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$5 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$2 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^2$ )

Es war deutlich zu sehen, daß die Bindungskonstanten für die Peptide der Gruppe His147 sich kaum unterschieden, wenn die Umgebung der DNA-Sequenz von spezifisch zu unspezifisch für die Peptide geändert wird. Dies ist ein eindeutiger Nachweis für die unspezifische Natur der Bindung dieser Peptide. Die Bindungskonstanten für die Peptide der Gruppe Arg145 sinkt um den Faktor zehn auf einen Wert bis etwa  $5 \cdot 10^2$ . Es ist wahrscheinlich, daß es sich hierbei um eine Restbindungsaktivität handelt.

Damit erhalten die Bindungskonstanten der Gruppe Arg145 eine neue Aussagekraft: Die Bindung findet bevorzugt an der DNA-Sequenz GAN(N)TC statt.

### 3.3.3.2 Bindung modifizierter Peptide an Oligonukleotide

Während in der Gruppe der unmodifizierten Peptide die Positionen der Verknüpfung variieren, beginnen die Arme der modifizierten Peptide der Gruppen  $\alpha 4$ , Ser143, Gly142 und Gly145 mit der Aminosäure Arg145, diese Gruppe dient daher als Referenzgruppe.

#### Peptidgruppe $\alpha 4$

Im Vergleich zu den Experimenten von Jeltsch *et al.* (1995b) wurden bidentate Peptide mit der gleichen Sequenz wie das dort verwendete  $\alpha 4$  hergestellt und die Bindungskonstanten ermittelt (Tabelle 3.17). Die Werte für die Referenzgruppe Arg145 sind der Tabelle 3.15 entnommen.

Tab. 3.17: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die Peptidgruppe  $\alpha 4$  an das Oligonukleotid B/C im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145

Sequenz	Arg145 <sub>mono</sub>	Arg145 <sub>C1</sub>	Arg145 <sub>C4</sub>	$\alpha 4$ <sub>mono</sub>	$\alpha 4$ <sub>C1</sub>	$\alpha 4$ <sub>C4</sub>
<b>EcoRI</b>	$<10^2$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	$1 \cdot 10^4$ ( $\pm 9 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^2$ ( $\pm 4 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )
<b>EcoRV</b>	$<10^2$	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^2$ ( $\pm 4 \cdot 10^2$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^3$ )

Im Gegensatz zum Peptid Arg145<sub>mono</sub> war bei  $\alpha 4$ <sub>mono</sub> eine schwache Bindung an die Sequenzen von EcoRI und EcoRV meßbar. Analog zu den Ergebnissen der Referenzgruppe Arg145 fand durch die Verknüpfung zum bidentaten Peptid eine Erhöhung der Bindungskapazität statt (etwa Faktor zehn). Dabei schien das Peptid  $\alpha 4$ <sub>C4</sub> eine etwas bessere Bindungskonstante aufzuweisen als  $\alpha 4$ <sub>C1</sub>. Insgesamt fand jedoch keine Unterscheidung zwischen den Sequenzen von EcoRI und EcoRV statt. Im Vergleich zur Gruppe His147 läßt sich daraus schließen, daß es sich um unspezifische Bindung handelt (vergleiche auch 3.3.3.3)

Im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145 waren alle Bindungskonstanten für die EcoRI-Spaltstelle von  $\alpha 4$ <sub>C1</sub> und  $\alpha 4$ <sub>C4</sub> kleiner als von Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub>. Auf der EcoRV-Sequenz erschien dieser Effekt nicht so ausgeprägt, und war beim *Linker* Lysin (C4) gar nicht zu erkennen.

#### Peptidgruppe Ser143

Im EcoRI-DNA-Kokristall zeigt die Seitenkette der Aminosäure Ile143 von der DNA weg und scheint keinen Kontakt zur DNA auszubilden. Um die Hydrophilie der *Extended chain* zu erhöhen, ist es sinnvoll, diese hydrophobe Aminosäure auszutauschen. Dadurch sollten hydrophobe Wechselwirkungen der Peptidarme untereinander erschwert werden und ein Öffnen der Arme für die DNA begünstigt sein. Tabelle 3.18 faßt die Bindungskonstanten für die Peptidgruppe Ser143 zusammen. Die Werte für

die Referenzgruppe Arg145 sind der Tabelle 3.15 entnommen.

Tab. 3.18: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die Peptidgruppe Ser143 an das Oligonukleotid B/C im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145

Sequenz	Arg145 <sub>mono</sub>	Arg145 <sub>C1</sub>	Ser143 <sub>mono</sub>	Ser143 <sub>C1</sub>
<b>EcoRI</b>	$<10^2$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	$3 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$<10^2$
<b>EcoRV</b>	$<10^2$	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )	$6 \cdot 10^2$ ( $\pm 3 \cdot 10^2$ )	$2 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )

Insgesamt ergaben sich nur sehr kleine Bindungskonstanten für die Peptide dieser Gruppe für die Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *EcoRV*, dabei schien die Spaltung durch *EcoRV* etwas stärker gehemmt zu sein als die durch *EcoRI*. Die Verknüpfung zum bidentaten Peptid ergab keine Veränderung der Bindungskonstante.

Im Vergleich zur Referenzgruppe waren die Bindungskonstanten um den Faktor 100 gesunken. Durch den Austausch wurde eine hydrophobe Aminosäure, die in der DNA-Kokristallstruktur keine Funktion an der DNA aufzuweisen scheint, durch eine hydrophile ersetzt (vergleiche auch Abbildung 4.4). Die geringe Bindungskapazität der Peptide dieser Gruppe zeigt deutlich, daß die Strukturen, die von den Peptidarmen ausgebildet werden, nicht mit jener im Kristall zu vergleichen sind, da der Austausch eines Aminosäurerestes, der nach der Kristallstruktur keine Auswirkungen haben sollte, zu drastischen Einbußen der Bindungsfähigkeit führt.

Bislang existieren keine Ile143-Mutanten auf Proteinebene, welche die Kristallstruktur untermauern könnten.

#### Peptidgruppen Gly142 und Gly145

In der DNA-Kokristallstruktur ergibt sich eine perfekte Paßform der *Extended chain* entlang der großen Grube. Es ist jedoch möglich, daß für die Bindung der DNA durch ein bidentates Peptid eine größere Flexibilität im Vergleich zum Enzym erforderlich ist. Durch die Einführung von Glycinen zwischen dem *Linker* und der Aminosäure Arg145 ist eine flexiblere Ausrichtung der Arme möglich. Unter Umständen können so auftretende Spannungen zwischen dem *Linker* und dem Kontakt der Aminosäuren Arg145 und Glu144 vermieden werden. Diese Peptide sind der Gruppe Gly145 zugeordnet.

Analoge Überlegungen führen zu einem Ersatz der Aminosäuren Arg145, Glu144 und Ile143 durch Glycine. Das Entfernen der potentiellen Salzbrücke zwischen Arg145 und Glu144 ergibt für die Peptidarme eine größere konformationelle Freiheit, die der DNA-Bindung zuträglich sein kann. Diese Peptide sind der Gruppe Gly142 zugeordnet.

Tabelle 3.19 zeigt die ermittelten Bindungskonstanten für die Peptide beider Gruppen. Die Werte für die Referenzgruppe Arg145 sind der Tabelle 3.15 entnommen.

Tab. 3.19: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die Peptidgruppen Gly142 und Gly145 an das Oligonukleotid B/C im Vergleich zur Referenzgruppe Arg145

Sequenz	Arg145 <sub>mono</sub>	Arg145 <sub>C1</sub>	Gly145 <sub>mono</sub>	Gly145 <sub>C1</sub>	Gly142 <sub>mono</sub>	Gly142 <sub>C1</sub>
<b>EcoRI</b>	$<10^2$	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$2 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$1 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$2 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )
<b>EcoRV</b>	$<10^2$	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )	$8 \cdot 10^2$ ( $\pm 4 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$<10^2$	$8 \cdot 10^2$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )

Die Bindungskonstanten aller Peptide waren für die *EcoRI*- und *EcoRV*-Erkennungssequenzen sehr klein, sie lagen gerade oberhalb der Detektionsgrenze. Eine Verknüpfung zum bidentaten Peptid ergab keine Verbesserung der Bindungskonstante

Die zusätzlichen drei Glycine hinter Arg145 führten zu einem Verlust der Bindungskapazität der Peptide. Offenbar ist die Positionierung der Peptidarme in Arg145<sub>C1</sub> durch den *Linker* DAP (C1) erforderlich, um eine Bindung an DNA zu erreichen. Sie ist jedoch nicht stark genug, um die Glycine zu tolerieren.

Der Austausch der Aminosäuren Ile143 bis Arg145 bewirkte einen Verlust der Bindungskapazität des Peptids. Daher ist zu schließen, daß Ile143 bis Arg145 entweder für die Ausrichtung des Peptids und/oder für die Bindung selbst benötigt werden.

### 3.3.3.3 Bindung in Gegenwart von poly-dIdC

Unspezifische DNA im Reaktionsansatz wirkt als Kompetitor für die Bindung der spezifischen DNA durch ein Peptid. Bindet es spezifisch an eine der Erkennungssequenzen, stört der Zusatz anderer DNA-Moleküle nicht, handelt es sich jedoch um unspezifische Bindung, wird die die angebotene DNA in gleicher Weise gebunden wie das zu detektierende Oligonukleotid. Zugesezt wurde 5 $\mu$ M poly-dIdC, das durch seine artifizielle Sequenz als unspezifische DNA anzusehen ist. Damit war es um den Faktor 100 höher konzentriert als das detektierte Oligonukleotid, es lag jedoch noch immer ein Peptidüberschuß vor.

Tabelle 3.20 gibt die gemessenen Bindungskonstanten wider. Die Werte ohne Zusatz von poly-dIdC entsprechen den Werten aus Tabellen 3.15 und 3.17.

Tab. 3.20: Bindungskonstanten [ $M^{-1}$ ] für die Peptidgruppen Arg145 und  $\alpha 4$  an das Oligonukleotid B/C mit und ohne poly-dIdC in der Messung

Sequenz	Gruppe Arg145		Gruppe His147		Gruppe $\alpha 4$		
	C1	C4	C1	C4	mono	C1	C4
<b>EcoRI</b>	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 8 \cdot 10^3$ )	$1 \cdot 10^4$ ( $\pm 9 \cdot 10^3$ )	$1 \cdot 10^4$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 1 \cdot 10^4$ )	$4 \cdot 10^2$ ( $\pm 4 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )
<b>EcoRV</b>	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^2$ )	$3 \cdot 10^4$ ( $\pm 2 \cdot 10^4$ )	$3 \cdot 10^4$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )	$3 \cdot 10^2$ ( $\pm 4 \cdot 10^2$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^3$ ( $\pm 7 \cdot 10^3$ )
<b>EcoRI poly-dIdC</b>	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 2 \cdot 10^4$ )	$2,6 \cdot 10^3$ ( $\pm 5 \cdot 10^2$ )	$4,6 \cdot 10^3$ ( $\pm 1 \cdot 10^2$ )	$9 \cdot 10^3$ ( $\pm 8 \cdot 10^2$ )	$6 \cdot 10^2$ ( $\pm 3 \cdot 10^2$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^2$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^3$ )
<b>EcoRV poly-dIdC</b>	$1,6 \cdot 10^4$ ( $\pm 5 \cdot 10^3$ )	$4 \cdot 10^3$ ( $\pm 4 \cdot 10^3$ )	$2 \cdot 10^4$ ( $\pm 1 \cdot 10^4$ )	$2,4 \cdot 10^4$ ( $\pm 4 \cdot 10^3$ )	$7 \cdot 10^2$ ( $\pm 2 \cdot 10^2$ )	$5 \cdot 10^3$ ( $\pm 2 \cdot 10^3$ )	$3,4 \cdot 10^3$ ( $\pm 3 \cdot 10^2$ )

Alle Werte variieren nur um den Faktor zwei. Durch die Messungen mit dem unspezifischen Oligonukleotid H/M ist jedoch bekannt, daß die Gruppe His147 unspezifisch an DNA bindet, während die Gruppe Arg145 spezifische Bindung aufweist. In diesem Experiment ist jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Offenbar ist der Überschuß an Peptid noch immer groß genug, um eine unspezifische Bindung am Meßoligonukleotid zuzulassen.

Daher kann aus den Messungen in Gegenwart von poly-dIdC keine Aussagekraft für die Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung der Peptide gewonnen werden.

## 4 DISKUSSION

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* entfaltet ihre enzymatische Aktivität als homodimeres Molekül. In konzentrierten Lösungen findet eine Tetramerisierung statt, wobei jedoch die Spaltaktivität voll erhalten bleibt [Modrich & Zabel, 1976]. Der Kontakt zwischen den Untereinheiten wird durch eine hydrophobe Interaktionsfläche gehalten, die aus mehreren  $\alpha$ -Helices aufgebaut wird (vergleiche Abbildung 1.2). Die Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  bilden im Dimer ein Vier-Helix-Bündel, dessen Dipolmoment auf die DNA gerichtet ist [Rosenberg, 1991].

Nur als Homodimer ist spezifische Bindung der kognaten Sequenz möglich, und das Enzym kann alle Kontakte zur DNA ausgebildet. Während Erkennung und Katalyse gut verstanden sind, stehen noch Fragen hinsichtlich der Kommunikation zwischen und auch innerhalb der Untereinheiten während dieser Prozesse offen. In engem Zusammenhang dazu steht die Notwendigkeit, die Eigenschaften einer monomeren Restriktionsendonuklease genauer zu verstehen.

### 4.1 Dimerisierungszustand von wt-*EcoRI* und Mutanten der Position Leu158 in Abhängigkeit vom Affinitätstag

Die Funktion der spezifischen DNA-Erkennung und -Spaltung der Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist auf die Kooperation beider Untereinheiten angewiesen. Von jeder Seite aus werden Kontakte vor allem zu einer Halbseite der DNA ausgebildet (Abbildung 4.1). Durch die Phosphatkontakte wird das Rückgrat am Enzym verankert, so daß eine Aufwindung der großen Grube möglich wird. Die dabei hervorgerufenen Konformationsänderungen in beiden Reaktionspartnern schaffen Platz für die Einlagerung der Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ , und die Kontakte werden optimal aufeinander abgestimmt (*Induced fit*). Erst in diesem Zustand können Spaltungen der Phosphodiesterbindungen erfolgen.

Die Dissoziation des Dimers in Monomere führt so zunächst zu einer eingeschränkten DNA-Bindungsfähigkeit. Es kann nur noch eine DNA-Halbseite kontaktiert werden (vergleiche Abbildung 4.1), und ein Aufdrehen der großen Grube ist nicht mehr möglich. Daher sollte auch die Einlagerung der Erkennungshelices erschwert sein. Die Spaltaktivität ist nicht länger durch die zweite Untereinheit auf die kognate Sequenz gerichtet, sondern relaxiert.

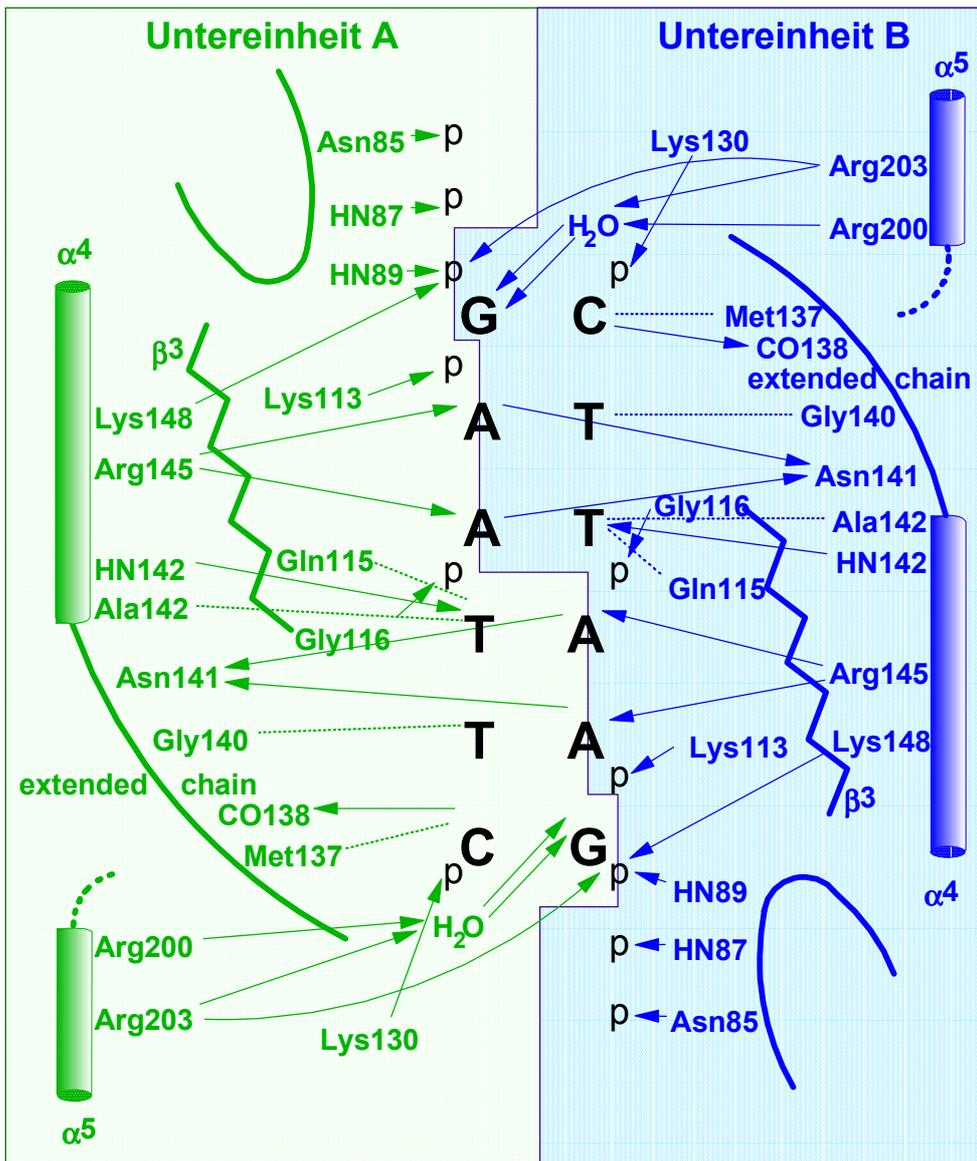


Abb. 4.1: Kooperation der Untereinheiten von *EcoRI* bei der Substraterkennung

Um die Eigenschaften einer monomeren Restriktionsendonuklease genauer zu untersuchen, wurde die hydrophobe Kontaktfläche durch die Einführung geladener Aminosäuren gezielt destabilisiert [Vennekohl, 1996]. Gewählt wurden dafür die Aminosäurepositionen Leu158 und Ile230, die sich in der Interaktionsfläche des Enzyms befinden. Dabei steht das Leucin der einen Untereinheit Isoleucin der anderen gegenüber (vergleiche Abbildungen 3.15 und 4.2).

Durch Austausch dieser Reste gegen Aspartat und/oder Lysin wurde eine Reihe von acht Mutanten hergestellt. Abhängig von Verdünnung und Temperatur enthalten die Lösungen eine dem Gleichgewicht entsprechende Konzentration an aktiven Dimeren, die ein kanonisches Spaltmuster erzeugen. Gleichzeitig kann dabei ein unspezifischer Abbau der Banden beobachtet werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Zerfall in monomere Untereinheiten und dem Auftreten der Nickaseaktivität konnte durch die Experimente erbracht werden. Bei Proteinvarianten mit der Mutation L158D wurde eine Destabilisierung der Homodimere erreicht. CD-Spektroskopie zeigt

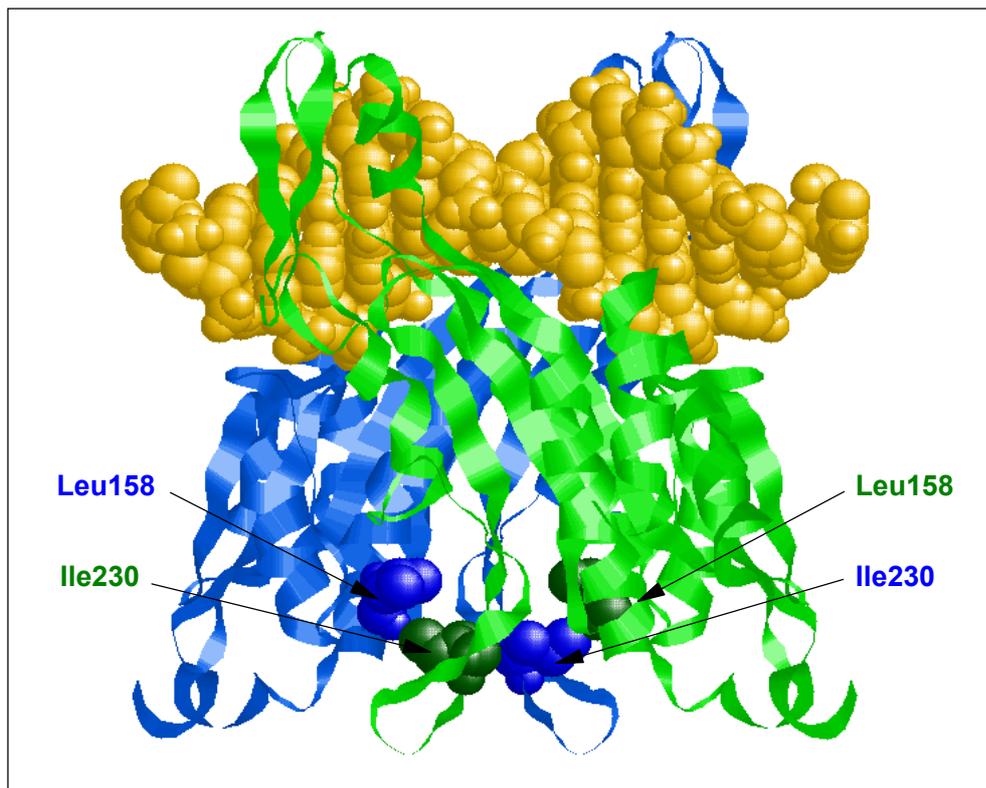


Abb. 4.2: Positionen der Aminosäuren Leu158 und Ile230 in der homodimeren *EcoRI*

te, daß die Strukturen dieser isolierten Untereinheiten nicht mehr jene dimerer *EcoRI* aufweisen. Dennoch kann es sich nicht um eine irreversible Veränderung handeln, da diese Proteinvarianten nach wie vor zur Bildung von Heterodimeren fähig sind.

Die verminderte Spaltaktivität dieser Mutanten ist nicht auf eine verringerte katalytische Aktivität zurückzuführen, sondern auf eine reduzierte Anzahl spaltaktiver Dimere in der Lösung. Aufgrund der großen Entfernung der Mutationen zum aktiven Zentrum muß davon ausgegangen werden, daß vorhandene Dimere wt-Aktivität aufweisen. Dies wurde durch die wt-ähnlichen Mutanten L158K<sub>His6</sub>, I230K<sub>His6</sub> und I230D<sub>His6</sub> belegt.

Ein Aspartat an der Position 158 hat großen Einfluß auf die Stabilität des Homodimers. Dabei können zwei Faktoren eine Rolle spielen: Zum einen hat Aspartat eine größere Raumerfüllung als Leucin, zum anderen trägt es eine Ladung. Dagegen hat ein Austausch des korrespondierenden Ile230 gegen Aspartat keine gravierenden Konsequenzen, diese Mutante wurde der wt-ähnlichen Gruppe zugeordnet [Vennekohl, 1996]. Um ein genaueres Bild von der Wirkung des Aspartats an der Position 158 auf die Interaktionsfläche zu gewinnen, wurden weitere Aminosäureaustausche an dieser Position und an 230 vorgenommen. Asparagin bringt im Vergleich zu Aspartat die gleiche Größe mit, ist aber ungeladen. Histidin dagegen trägt unter Umständen eine positive Ladung und hat einen größeren Raumbedarf.

Die Aktivität der Mutante L158H<sub>His6</sub> konnte bei 37°C zu  $2,4 \cdot 10^2$  U/mg bestimmt werden. Dieser Wert war allerdings erst bei mikromolarer Enzymkonzentration meßbar,

die somit um etwa den Faktor 1000 höher lag als für wt-ähnliche Mutanten nötig. Dabei zeigte sich schon bei den ersten Zeitwerten eine Nukleaseaktivität, die als Indikator für monomere Enzymanteile gewertet wurde. Die Bestimmung der spezifischen Spaltaktivität war nur aufgrund der hohen Enzymkonzentration möglich, die einen stabilisierenden Einfluß auf die Dimere hatte, so daß das Enzym die Spaltung beenden konnte.

Alle Experimente wurden jeweils mit frisch verdünnten Lösungen durchgeführt, die vor Beginn der Kinetik nicht über 4°C erwärmt wurden. Wenn unter diesen Bedingungen eine Kinetik bei 16°C gestartet wurde, so konnte L158H<sub>His6</sub> die Spaltung beenden. Die resultierende Spaltaktivität war nur um den Faktor drei kleiner als für das wt-Enzym bei 16°C. In den gemessenen Zeitabschnitten (bis fünf Stunden) zeigte sich in den Kinetiken keine unspezifische Nukleaseaktivität. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß unter diesen Bedingungen der überwiegende Teil der Mutante in dimerer, also aktiver Form vorliegt.

Die Unterschiede zwischen der spezifischen Aktivität bei den beiden Meßtemperaturen waren für die Mutante L158N<sub>His6</sub> noch ausgeprägter. Bei 37°C trat kein vollständiges Spaltmuster auf, die entstehenden Banden wurden von Beginn an durch unspezifische Nukleaseaktivität abgebaut. Bei 16°C allerdings ergab sich eine zu L158H<sub>His6</sub> vergleichbare Spaltaktivität.

Im Gegensatz dazu zeigte L158D<sub>His6</sub> bei 37°C keine kanonische Spaltaktivität, bei 16°C waren nur ansatzweise Banden zu erkennen, es entstand jedoch nie ein vollständiges Spaltmuster.

Im Vergleich der Mutanten an der Position 158 erscheint die hier dargestellte Mutante L158H<sub>His6</sub> als diejenige mit der größten Anzahl aktiver Dimere. Die Mutante L158N<sub>His6</sub> ist ebenfalls aktiver als L158D<sub>His6</sub>. Analoge Ergebnisse wurden durch die Analyse der DNA-Bindungsfähigkeit der Proteine gewonnen. Bei der Mutante L158D<sub>His6</sub> war keine spezifische Bindungskonstante bestimmbar, während sie für die Asparagin- und die Histidin-Mutante nur um den Faktor 100 geringer war als beim wt-Enzym.

Daher kann geschlossen werden, daß für die Störung der hydrophoben Kontaktfläche nicht allein die Größe der eingeführten Aminosäure von Bedeutung ist, da die größere Raumerfüllung des potentiell positiv geladenen Histidins besser toleriert wird als die Einführung einer negativen Ladung durch das Aspartat. Dies korreliert mit der Beobachtung, daß die Einführung eines Lysins, das eine zu Histidin vergleichbare Größe aufweist, an der gleichen Stelle ohne Einbuße in der Dimerstabilität möglich war [Vennekohl, 1996]. Die Mutante L158C<sub>His6</sub> zeigte keine Beeinträchtigung in der spezifischen Spaltaktivität (siehe auch 4.2). Das Cystein hat eine kleinere Raumerfüllung als Leucin, paßt sich aber gut einer hydrophoben Umgebung an.

Entsprechend I230D<sub>His6</sub> und I230K<sub>His6</sub>, die beide wt-analogenes Verhalten zeigten [Vennekohl, 1996], wies die Mutante I230H<sub>His6</sub> nur eine zehnfach geringere spezifi-

sche Aktivität als das wt-Enzym auf. Die Spaltaktivität bei 16°C sank jedoch nicht so stark ab wie beim wt-Enzym, dennoch ist zu schließen, daß diese Mutante in ihrem Monomer/Dimer-Gleichgewicht weitestgehend ungestört ist.

Unter Umständen ist die Lage der Aminosäure 230 im Protein dafür verantwortlich, daß hier eine bessere Toleranz eingeführter Aminosäurereste besteht: Sie befindet sich in einem *Loop* zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern, der gegenüber dem Enzymkörper, in dem sich die Aminosäure 158 befindet, größere Flexibilität aufweist. Ein Austausch gegen eine räumlich anspruchsvollere Aminosäure mag den *Loop* vom Rest des Enzyms etwas entfernen, wird aber nicht durch andere Proteinteile sterisch gehindert (vergleiche Abbildung 4.2).

Spaltungen mit Proteinvarianten der Mutation L158D auf  $\lambda$ -DNA erschienen als unspezifischer Abbau, der keine Ähnlichkeit mehr mit dem Bandenmuster der kanonischen Spaltung an GAATTC erkennen ließ. Die Aktivität der wenigen dimeren Moleküle, die unter den gewählten Bedingungen existierten, wurde von der unspezifischen Aktivität verdeckt.

Um eine Charakterisierung der Spalteigenschaften dieser Proteine zu ermöglichen, wurde die Spaltung einzelner Sequenzen verfolgt. Bei Verwendung von radioaktiv markierter Plasmid-DNA in Kombination mit DNA-Sequenzierung ist eine Zuordnung entstehender Spaltprodukte möglich. Für die Analyse solcher Sequenzen ist allerdings wichtig, daß nur diejenigen als Spaltung bewertet werden, die eine Zunahme der Bandenstärke über die Zeitdauer einer Kinetik aufweisen, da es sich andernfalls um statistische Abbrüche der DNA-Polymerase bei der Herstellung des Substrats handeln kann. Mit einer solchen Analyse wurden 76 Sequenzen ermittelt, die von der Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> und den Doppelmutanten L158D-I230K<sub>His6</sub> sowie L158D-I230D<sub>His6</sub> gespalten wurden (siehe Anhang 2).

Zunächst fällt auf, daß die gespaltenen Sequenzen für alle drei Mutanten überwiegend gleich sind (vergleiche Abbildung 3.8). Im Vergleich zu den Einzelmutanten I230K<sub>His6</sub> und I230D<sub>His6</sub> erscheint das nicht ungewöhnlich, da beide Mutanten keine großen Abweichungen vom wt-Enzym zeigen, und somit die Enzymeigenschaften der Doppelmutanten durch die Mutation L158D bestimmt werden. Die Tatsache, daß die Reaktion von drei separat präparierten Enzymen mit guter Reproduzierbarkeit in sehr vergleichbarer Weise ausgeführt wurde, spricht gegen eine zufällige Spaltung dieser Sequenzen. Weiterhin sollte bei einer gänzlich unkritischen Auswahl von zu spaltenden Sequenzen keine gezielte Zunahme der Bandenstärke im Gel zu erkennen sein. Trotz der Tatsache, daß von den 76 ermittelten Sequenzen keine doppelt vorkam, muß von einer gerichteten Spaltung durch die Enzyme ausgegangen werden.

Die Analyse der Sequenzen gibt allerdings keinen Hinweis auf die Natur der Erkennung. Abbildung 3.8 stellt deutlich eine Spaltung der kanonischen Sequenz durch die Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> dar, während die Doppelmutanten nur eine schwache

Bande zeigten. Es ist wahrscheinlich, daß die Spaltung dieser Sequenz durch einige dimere Moleküle hervorgerufen wurde, die sich in der Lösung befanden. Die Nickaseeigenschaft des Enzyms hat im Vergleich dazu eine geringere Aktivität, so daß entsprechend viel Enzym in den Test eingesetzt wurde. Daher war die Spaltung der kanonischen Sequenz schon abgeschlossen, während bei der Spaltung durch das wt-Enzym deutlich eine Zunahme in der Bandenstärke zu erkennen ist.

Von größerem Interesse sind allerdings diejenigen Sequenzen, die vom wt-Enzym nicht erkannt wurden. Die Aktivität der Mutante L158D<sub>His6</sub> war für diese Sequenzen wesentlich kleiner als für die kanonische Sequenz. Die verringerte Spaltaktivität läßt sich auf eine schwache DNA-Bindungsstärke und ein vermutlich schlecht positioniertes katalytisches Zentrum zurückführen. Die 76 ermittelten Sequenzen ergeben keine Konsensussequenz, für die eine Spaltung durch die Mutanten vorhergesagt werden kann. Es bestehen keinerlei Ähnlichkeiten der Basenabfolgen mit der kanonischen oder einer *Star*-Sequenz. Im Vergleich der Spaltungen beider Einzelstränge eines Plasmids konnte keine gezielte Spaltung des Doppelstrangs ermittelt werden. Es handelt sich daher bei den Proteinvarianten mit der Mutation L158D um echte Nickasen, die nach der Spaltung eines Strangs von der DNA abdissoziieren. Diese Tatsache ist nicht unerwartet, da die Enzyme im Gegensatz zum dimeren wt-Enzym mit nur einem aktiven Zentrum ausgestattet sind, und keine Möglichkeit für eine Spaltung des Doppelstrangs besteht. Erst die unabhängige und zufällige Spaltung des jeweils anderen Einzelstrangs führt zu einem Doppelstrangbruch, wie er bei der Degradation von  $\lambda$ -DNA beobachtet werden konnte.

Da die Auswahl der Spaltstellen sequenzunabhängig war, müssen andere Kriterien ausschlaggebend sein, wie zum Beispiel die Flexibilität der DNA. Während der Spaltung durch eine homodimere *EcoRI* finden konformationelle Änderungen im Enzym wie in der DNA statt, so daß die zu spaltenden Phosphodiesterbindungen in eine optimale Position gebracht werden (vergleiche auch Abbildung 4.1). Ohne die Hilfe der zweiten Untereinheit, die die DNA mit umfaßt, ist dem monomeren Enzym die Deformation der DNA, vor allem die Aufwindung der großen Grube, nicht möglich. Daher scheint es plausibel, daß Sequenzen, die dem Enzym geringeren Widerstand entgegensetzen, leichter gespalten werden.

Eine ähnliche Substraterkennung liegt bei der unspezifischen Nuklease DNase I vor, die eine Sequenz von sechs Basenpaaren in der kleinen Grube bindet und die DNA in Richtung zur großen Grube biegt, um sie anschließend zu spalten [Bukner *et al.*, 1995]. Dabei erweisen sich flexible DNA-Sequenzen als bessere Substrate, so daß ein für einen DNase I-Abbau typisches Muster entsteht.

Alle Daten weisen stark darauf hin, daß es sich bei der Mutante L158D<sub>His6</sub> um ein Enzym mit überwiegend monomerem Proteinanteil handelt. Schon früher wurden mutierte Proteine isoliert, die in ihrer Homodimerbildung beeinträchtigt waren. Aufgrund

der 1986 veröffentlichten Röntgenstruktur [McClarín *et al.*, 1986] wurden die Mutanten E144Q-R145K und E144Q-R145K-R200K hergestellt, um die DNA-Bindung zu untersuchen [Geiger *et al.*, 1989]. Bei ihnen wurde ein verändertes Monomer/Dimer-Gleichgewicht mit einer Erhöhung des monomeren Anteils festgestellt. Die entsprechenden Einzelmutanten Q144E und R145K zeigten dagegen lediglich eine eingeschränkte Spaltaktivität, jedoch keine Beeinträchtigung der Dimerbildung [Wolfes *et al.*, 1986]. Die Lage des Gleichgewichts wurde durch Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation bestimmt, wobei sich eine hohe Abhängigkeit des Gleichgewichts von der Salzkonzentration der Lösung zeigte.

Ein direkter Nachweis des monomeren Zustands für L158D<sub>His6</sub> analog zu diesen Experimenten konnte nicht erbracht werden, da Proteine mit einem fusionierten Hexahistidintag in der Gelfiltration über einen sehr breiten Molekulargewichtsbereich eluierten und eine Bestimmung des Dimerisierungszustandes so nicht möglich war [Vennekohl, 1996]. Durch andere Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, daß diese Mutante in anderer Struktur vorliegt als das wt-Enzym:

Der Abbau durch die Peptidase Trypsin erfolgt über ein anderes Bandenmuster als beim wt-Enzym, und die Reaktion ist deutlich verlangsamt. Dies spricht für eine globuläre Struktur der monomeren Untereinheiten, bei deren Bildung vermutlich hydrophobe Proteinteile ins Innere verlagert wurden.

In *Cross link*-Experimenten konnte lediglich gezeigt werden, daß in der Mutante L158D<sub>His6</sub> andere Proteinteile einander nahe kommen als bei wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>. Die schlechte Reproduzierbarkeit der *Cross link*-Experimente zur Analyse des Dimerisierungszustandes kann ebenfalls durch den Affinitätstag bedingt sein, der zu einer Aggregation monomerer wie dimerer Moleküle führt. Es ist nicht möglich, detailliertere Schlüsse aus diesen Ergebnissen zu ziehen.

Ein wichtiger Hinweis auf die Natur der Mutanten wurde durch native Gel-Elektrophorese erbracht: Im Vergleich zu wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> zeigte sich hier eine deutliche Verschiebung der Dimerisierungsgleichgewichte in Richtung der monomeren Spezies. Allerdings war bei den Einzelmutanten wie auch den entsprechenden Doppelmutanten deutlich ebenfalls eine Bande bei höherem Molekulargewicht zu sehen, die jedoch nicht auf der Höhe des dimeren wt-Enzyms erschienen. In der wt-Präparation sind unter diesen Bedingungen im Gel ebenfalls zwei Banden zu erkennen, die der dimeren und der tetrameren Form zugeordnet werden. Die Elektrophorese scheint daher die Bildung der Tetramere nicht zu unterbinden. In Analogie zum wt-Enzym ist es bei den Mutanten möglich, daß die Tetramerisierungsfläche, die in den Mutanten unverändert erhalten ist, genutzt wird, um ein alternatives Dimer zu bilden. Durch die Störung der Dimerisierungsfläche muß diese Kontaktfläche nicht betroffen sein. Dieses Dimer wird im folgenden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und meint die Bildung eines Dimers aus monomeren Untereinheiten über die wt-Tetramerisierungsfläche. Ein Laufunterschied für das Dimer\* im Vergleich zum normalen Dimer er-

scheint plausibel, da in dem nativen Gelsystem eine Trennung nach der Größe und Form der Enzyme stattfindet. Es ist unwahrscheinlich, daß das Dimer\* eine globuläre Struktur wie das native Dimer einnehmen kann.

In der Analyse von *EcoRI*-DNA-Komplexen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie wurde die tetramere Form des Enzyms als konzentrationsabhängige Aggregation zweier Dimere bestimmt [Johannssen *et al.*, 1984]. Dabei erschien das Tetramer in tetraedrischer Form, in der sich die beiden Dimere auf zwei orthogonalen Ebenen befanden. Die Tetramere wurden vorzugsweise an Kreuzungspunkten der DNA gefunden, daher ist sicher, daß beide dimeren Anteile der Tetramere bindungsaktiv waren, deren volle Spaltaktivität schon zuvor nachgewiesen wurde [Modrich & Zabel, 1976]. Es muß also davon ausgegangen werden, daß die Tetramerisierung keinen Einfluß auf die Eigenschaften des Dimers hat. Analog kann geschlossen werden, daß die Mutante L158D<sub>His6</sub>, die als Dimer\* vorliegt, die Eigenschaften eines monomeren Enzyms nicht verloren hat.

Eine Lokalisation der Tetramerisierungsfläche war bislang jedoch nicht möglich. Es ist nicht anzunehmen, daß es sich dabei um einen hydrophoben Kontakt zwischen den Dimeren handelt, da die Bildung des Tetramers von der Konzentration der Restriktionsendonuklease abhängig ist, und nicht immer stattfindet. Unter Bedingungen, bei denen das wt-Enzym dimer vorliegt, wäre dann diese hydrophobe Fläche dem Medium zugekehrt. Tatsächlich war in einer Analyse der Oberfläche kein solcher Bereich lokalisierbar. In der Kokristallstruktur mit DNA enthält die Einheitszelle nur ein Dimer, so daß aus den Strukturdaten keine Informationen abzuleiten waren.

Durch den Hexahistidintag sind weitere Schwierigkeiten in der Bestimmung des Dimerisierungszustandes der Mutante L158D<sub>His6</sub> bedingt. Durch analytische Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, daß die Aggregation von wt-*EcoRI*<sub>His6</sub> von sechs bis acht Untereinheiten einem dynamischen Gleichgewicht entspricht, das durch den Affinitätstag hervorgerufen wurde. Für L158D<sub>His6</sub> ergab sich ein vergleichbares Gleichgewicht, das jedoch im Gegensatz zum wt-Enzym Monomere als kleinste Teilchen enthielt.

Nach der Klonierung des Hexahistidintags wurden zahlreiche Untersuchungen mit dem Fusionsprotein ausgeführt [Rotzal, 1992]. Im Hinblick auf DNA-Bindung und -Spaltung, Wechselzahlen auf Plasmid-DNA und Oligonukleotiden sowie CD-Spektroskopie konnte kein Unterschied zwischen *EcoRI* mit und ohne Affinitätstag festgestellt werden, da in den verwendeten Meßverfahren eine hohe Verdünnung der Enzyme eingesetzt wurde. Hinweise auf eine Aggregation wurden in einem Gelretardations-Assay zur Bestimmung der spezifischen DNA-Bindungskonstante gefunden, die zeigten, daß der Einsatz von höher verdünntem Protein zu einer gesteigerten Bindungskonstante führte [Küster, 1998]. Dies führte zu der Annahme, daß in verdünnter Lösung eine größere Anzahl bindungsaktiver Dimere vorlag, die für eine Bestimmung der Bindungskonstante relevant waren. Das bedeutete jedoch gleichzeitig, daß die

Aggregate in ihrer DNA-Bindung gestört waren und so zwangsläufig Experimente, die in höherer Konzentration ausgeführt wurden, behindern mußten. In diesem Licht erhalten auch die Gelfiltrationsexperimente eine andere Bedeutung: Die Verbreiterung der Banden zu einem einzigen Signal ist weniger auf eine Interaktion des Hexahistidintags mit dem Gelmaterial zurückzuführen, als vielmehr auf die Aggregation von *EcoRI*<sub>His6</sub>.

Schon nach der Klonierung des Hexahistidintags wurde ein proteolytischer Abbau der Histidine versucht aber nicht erreicht [Rotzal, 1992]. Zum Abbau bietet sich Carboxypeptidase A (CPA) an, eine Exopeptidase, die C-terminale Histidine zu spalten vermag. Die erste Aminosäure der Restriktionsendonuklease nach dem Affinitätstag ist ein Lysin, das von der Peptidase nur mit stark verminderter Geschwindigkeit abgespalten werden kann. Alle Versuche, einen kontrollierten Abbau der Histidine zu erhalten, scheiterten jedoch an der Natur des Affinitätstags selbst: In hoher Konzentration lag *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> als Aggregat aus mehreren Dimeren vor. Da die Histidine als ausschlaggebend für die Aggregation nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, daß sie sich im Innern dieser Komplexe befanden, einem Aggregationskeim gleich, und daher der CPA unzugänglich waren. In größerer Verdünnung lösten sich diese Aggregate offenbar auf, und ein Abbau wurde möglich. Allerdings verlief er in dem dann vorliegenden Substrat *EcoRI* nicht nur bis zum Ende des Affinitätstags, sondern schritt weiter fort, so daß die Restriktionsendonuklease ihre Funktionsfähigkeit einbüßte. CPA wurde immobilisiert (Agarose) verwendet, daher war ein Einsatz in Form einer Säule möglich. Nach Anreicherung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix und eine Ionenaustauschersäule konnten jedoch nur maximal 0,2% der eingesetzten *wt-EcoRI*<sub>His6</sub> als funktionelles Protein ohne Affinitätstag wiedergewonnen werden.

Unter Umständen ist eine genaue Einregelung des Verhältnisses der Substratmenge und -konzentration zur CPA möglich, so daß ein definierter Abbau der Histidine stattfinden kann, diese Prozedur wäre jedoch für eine routinemäßige Entfernung des Affinitätstags nach der Aufreinigung nicht praktikabel.

Da die bestehenden Enzympräparationen nicht von ihrem Fusionsanteil getrennt werden konnten, bestand die Notwendigkeit, die fraglichen Enzyme mit einem anderen Affinitätstag auszustatten. Nach den beschriebenen Erfahrungen ist ein Protein, das nach der Aufreinigung keinen Affinitätstag mehr enthält, am sinnvollsten. Möglich erscheint dabei eine proteolytische Abspaltung des Tags nach der Aufreinigung durch eine Endopeptidase. Allerdings ergeben sich hier analog zu den Problemen mit dem enzymatischen Abbau durch CPA Schwierigkeiten in der Ausbeute solcher Reaktionen. Den vielversprechendsten Ansatz liefert das selbstspaltende Intein-System, das nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung durch Spaltung das unveränderte Protein von der Säule entläßt [Chong *et al.*, 1997]. Es konnte mit *EcoRI* jedoch nicht erfolgreich ausgeführt werden, da das Spleißen schon innerhalb der *E.coli*-Zellen erfolgte.

Die aggregationssteigernde Wirkung des Hexahistidintags scheint in der Anhäufung gleicher Aminosäuren begründet zu liegen. Durch Diversität in der Aminosäurezusammensetzung des Affinitätstags scheint daher eine Lösung für eine solche Problematik zu liegen. Aus diesem Grund wurde das *StrepTag II*-System für die Aufreinigung von *EcoRI* gewählt. Der *StrepTag II* besteht aus der Aminosäuresequenz WSHPQFEK und weist eine Affinitätskonstante von etwa  $1\mu\text{M}$  zum Affinitätsmaterial *StrepTactin* auf [Voss & Skerra, 1997].

Die Überexpression von *EcoRI* in *E.coli* erfordert eine stringente Regulation des Gens in der Zelle, um die schleichende Expression zu verhindern, die die Zelle tötet, sofern sich keine *EcoRI*-Methylase darin befindet. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde der *StrepTag II* in das bestehende Expressionssystem eingebracht, das den  $P_L$ -Promotor verwendet. Das resultierende Fusionsprotein wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> wurde exprimiert und über die Affinitätsmatrix *StrepTactin* aufgereinigt.

Im Vergleich zur Aufreinigung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose für Hexahistidin-Fusionsproteine wies das *StrepTag II*-System eine geringere Bindungsstärke auf, allerdings war die Verunreinigung durch zelluläre Proteine auf streptavidinbindende Proteine beschränkt, so daß sich eine bessere Aufreinigung in einem Einschrittverfahren für das Zielprotein ergab.

Mit diesem neuen Affinitätstag wurden die Proteine wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> und L158D<sub>StrepII</sub> charakterisiert. Wie schon bei der Klonierung des Hexahistidintags konnten zwischen den verschiedenen Fusionsproteinen in DNA-Bindung und -Spaltung sowie in der CD-Spektroskopie keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings zeigte L158D<sub>StrepII</sub> eine höhere Aktivität als L158D<sub>His6</sub>. So war dieses Enzym bei  $16^\circ\text{C}$  noch in der Lage, Banden des spezifischen Spaltmusters zu erzeugen, was dem korrespondierenden Enzym mit Hexahistidintag nicht gelang. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die L158D<sub>His6</sub>-Enzympräparation ein höheres Alter aufwies als jene von L158D<sub>StrepII</sub>. Zu Beginn der Arbeiten mit L158D<sub>His6</sub> zeigten sich auch hier spezifische Banden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die instabile Natur dieser Mutanten.

Eine erste analytische Ultrazentrifugation wurde mit den *StrepTag II*-Fusionsproteinen ausgeführt. Durch die geringen Konzentrationen nach der Dialyse gegen den Puffer UZ3, auch für wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>, konnten jedoch aus den Daten keine eindeutigen Aussagen über die Molekulargewichte der Proteine gemacht werden. Für die Mutante L158D<sub>StrepII</sub> ist aufgrund der geringen Konzentration ( $1,1\mu\text{M}$ ) eine neue Präparation erforderlich, um diese Untersuchungen auszuführen.

Möglich jedoch war eine Untersuchung des Aggregationszustandes dieser Fusionsproteine mittels Gelfiltration. Es konnte gezeigt werden, daß die Proteine mit *StrepTag II* keine für Hexahistidintag typische Bandenverbreiterung aufwiesen. Es ist bekannt, daß durch Interaktionen mit dem Säulenmaterial eine Verschiebung der Banden für *EcoRI* auftritt [Geiger *et al.*, 1989]. Im Vergleich mit den Standardproteinen BSA (68kDa) und Lysozym (14,4kDa) konnte für wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub> jeweils ein *Peak* für

monomere und dimere Proteinanteile zugewiesen werden. Der monomere Anteil wurde hier als erhöht im Vergleich zu *wt-EcoRI* ermittelt. Die Mutante L158D<sub>StrepII</sub> zeigte dagegen nur eine Bande für das monomere Protein. Damit gelang zum ersten Mal ein eindeutiger Beweis der monomeren Natur dieser Mutante.

Die erhöhten monomeren Anteile von *wt-EcoRI*<sub>StrepII</sub> sind vermutlich auf das Aufreinigerungsverfahren dieses Proteins zurückzuführen: Durch die gute Anreicherung mit dem *StrepTactin* wurde auf eine zusätzliche Ionenaustauschersäule verzichtet, da das Zielprotein bereits über 95% Reinheit aufwies. Diese Säule kann nach den bisherigen Erfahrungen durchaus einen Einfluß auf die Abtrennung monomerer oder unfunktionaler Proteinanteile aufweisen und wird bei Enzympräparationen für *StrepTag II*-Fusionsproteine in Zukunft durchgeführt werden.

## 4.2 Heterodimerisierung von *EcoRI*

Die Codierung einer homodimeren Restriktionsendonuklease kann auf einem Gen erfolgen und ist ein Beispiel für die Effizienz der Evolution. Nur im Zusammenspiel beider Untereinheiten kann das Enzym seine Funktion in der Zelle, die Restriktion eindringender Fremd-DNA, ausführen. Untersuchungen an monomeren Untereinheiten zeigen, daß DNA-Bindung und ihre spezifische Erkennung nur durch das dimere Enzym erreicht werden können, während die DNA-Spaltung auch durch eine einzelne Untereinheit möglich ist. Allerdings ist diese ungerichtet und nicht mehr auf die kanonische Sequenz beschränkt.

Die Kokristallstruktur des Enzyms mit spezifischer DNA zeigt eine DNA-Bindungsstelle, die von beiden Untereinheiten gemeinsam gebildet wird. Die Spaltung erfolgt im Doppelstrang durch jeweils ein katalytisches Zentrum. Dies kann in einer konzertierten Reaktion stattfinden aber auch in getrennten Ereignissen, zwischen denen das Enzym von der DNA abdissoziiert und erneut bindet [Langowski *et al.*, 1980; Alves *et al.*, 1989b]. In jedem Fall wird die Spaltung der Phosphodiesterbindung erst dann eingeleitet, wenn Enzym und DNA sich in einem spezifischen Komplex befinden, in dem die Kontakte zwischen Aminosäuren und DNA optimiert sind. Diese strikte Kopplung ist der Grund für die hohe Genauigkeit des Enzyms und kann nur durch eine Konformationsänderung von einer Untereinheit zur anderen übertragen werden. Durch die Spaltung asymmetrischer Oligonukleotide ist bekannt, daß die Erkennung eines Strangs durch eine Untereinheit gerade die andere zur Spaltung bringt, also in dem Strang, zu dem weniger Kontakte ausgebildet werden [Thielking *et al.*, 1990].

Die zugrundeliegende Kommunikation innerhalb einer und/oder zwischen den Untereinheiten kann in einem homodimeren Enzym nicht untersucht werden, da Meßergebnisse durch die Symmetrie des Enzyms nicht einer Untereinheit zugewiesen wer-

den können. Mutationen im Gen der Restriktionsendonuklease führen zu einer Änderung in beiden Untereinheiten, so daß eine Unterscheidung der Proteinteile in ihren Funktionen nicht möglich ist. Diese Vorgänge können nur an heterodimeren Enzymen untersucht werden, in denen durch Einführung unterschiedlicher Mutationen die Zuordnung erfolgen kann. Kombinationen von spalt- und/oder bindungsinaktiven Mutanten mit einer wt-Untereinheit sind geeignet, die Arbeitsweise des Enzyms genauer zu untersuchen.

Zur Herstellung heterodimerer Enzyme existieren prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze: Zum einen ist durch Dissoziation und Assoziation von Untereinheiten eine Bildung von Heterodimeren *in vitro* denkbar, zum anderen werden heterodimere Enzyme schon *in vivo* gebildet, wenn beide Untereinheiten gleichzeitig exprimiert werden. Beide Ansätze sind in der Literatur beschrieben [*in vitro*: Ward *et al.*, 1986; Distefano *et al.*, 1990; Bradshaw & Dunlap, 1993; *in vivo*: Distefano *et al.*, 1990; Greene *et al.*, 1993]. Die Herstellung und Aufreinigung von asymmetrischen EcoRV-Dimeren ist bereits erfolgreich ausgeführt worden [Wende *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 1996].

Im Falle der *in vitro*-Bildung eines Heterodimers ist die Lage dieses Gleichgewichts entscheidend von der Stabilität der Interaktionen der Untereinheiten abhängig. Mit einer ausgeprägten Wechselwirkung zwischen Homodimeren ist die Bildung von Heterodimeren ungünstig und dauert sehr lange. Ist der Kontakt innerhalb des Heterodimers nicht mindestens ebenso stark wie jener zwischen Homodimeren, kann keine angemessene Ausbeute an Heterodimeren erwartet werden. Diese Tatsache eröffnet jedoch auch die Möglichkeit für die Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Heterodimerbildung: Durch die Destabilisierung der homodimeren Spezies und gleichzeitige Begünstigung des Kontakts zwischen unterschiedlichen Untereinheiten wird die Bildung des Heterodimers bevorzugt stattfinden.

Für die Restriktionsendonuklease EcoRI ist die Destabilisierung der Homodimerisierungsfläche mit Einführung der Mutation L158D gelungen. In Kombination mit der korrespondierenden Mutation I230K, die der Position 158 in der anderen Untereinheit gegenübersteht, ergibt sich ein Enzym, das in seiner Spaltung aktiver ist als jedes der Homodimeren [Vennekohl, 1996]. In den Homodimeren existieren jeweils zwei veränderte Kontakte, zum einen die des Aspartats mit Isoleucin, der nicht ausgebildet wird, da die Mutante überwiegend monomer vorliegt, und zum anderen des Lysins zu Leucin. Im Heterodimer allerdings stehen sich dabei die mutierten Aminosäuren Aspartat und Lysin gegenüber. Gleichzeitig wird eine Hälfte des starken hydrophoben Kontakts durch die unveränderten Aminosäuren Leucin und Isoleucin gebildet, wodurch sich vermutlich die erhöhte Stabilität des Enzyms ergibt.

Im Vergleich zum wt-Kontakt ist das Heterodimer L158D/I230K jedoch weniger stabil und daher wird der Austausch von Untereinheiten wesentlich schneller sein als bei wt-EcoRI und empfindlich auf eine Änderung der Inkubationsbedingungen reagieren, wie er für die Mutanten der Position 158 dokumentiert wurde [Vennekohl, 1996]. Das

Heterodimer entzieht sich somit einer biochemischen Charakterisierung.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die kovalente Verknüpfung der Heterodimere nach ihrer Bildung. Dadurch werden sie an der Dissoziation gehindert, und es ergibt sich eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der Heterodimeren. Eine solche Verknüpfung ist durch *Cross link*-Reagenzien möglich. Sie tragen zwei funktionelle Gruppen an einem *Linker* und können so durch Reaktion mit zwei Proteinteilen diese miteinander verbinden. Das homobifunktionelle Reagenz Bismaleimidohexan (BMH) trägt zwei Maleimid-Gruppen im Abstand von 16,1Å, die spezifisch mit Thiolgruppen reagieren, die in Form von Cystein-Seitenketten angeboten werden können. Das einzige native Cystein in *EcoRI* befindet sich an der Position 218. Es ist in der Struktur verborgen und daher vom umgebenden Medium nicht erreichbar (vergleiche Abbildung 3.15).

Um eine *Cross link*-Reaktion zwischen beiden Untereinheiten zu erreichen, dürfen die zu verknüpfenden Aminosäureseitenketten nicht weiter als diese *Linkerlänge* voneinander entfernt sein. Zudem sollten die Positionen in ausreichender Entfernung vom katalytischen Zentrum und den DNA-bindenden Strukturen liegen, um eine Beeinflussung von Bindung und Spaltung zu vermeiden.

Diese Bedingungen werden von den Paaren Asp74/Lys221 (Abstand 10,1Å) sowie Lys226/Asp269 (Abstand 14,2Å) erfüllt, die auf der Oberfläche der *EcoRI* Salzbrücken ausbilden (siehe auch Abbildung 3.15). Um die Bedeutung der Kontakte für die Stabilität des Enzyms abschätzen zu können, wurden zunächst Austausche vorgenommen, welche durch eine Ladungsumkehr eines Partners der Brücke deren Ausbildung verhindert. Durch die Positionen auf unterschiedlichen Untereinheiten ist auch ein Einfluß auf das Monomer/Dimer-Gleichgewicht dieser Mutanten denkbar.

Die Mutanten D74K<sub>His6</sub>, K221D<sub>His6</sub>, K226D<sub>His6</sub> sowie D269K<sub>His6</sub> unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nicht wesentlich vom wt-Enzym. Sie sind in ihren spezifischen Spaltaktivitäten um weniger als den Faktor zehn verlangsamt. Dabei war keine unspezifische Nukleaseaktivität zu detektieren. Auch DNA-Bindungskonstanten und CD-Spektroskopie wiesen auf ein wt-analoges Verhalten hin.

Für die Mutante D269K<sub>His6</sub> ergaben sich jedoch Unterschiede im Aufreinigungsverhalten. Auch durch ausführliche Variationen der Bedingungen konnte die Enzympräparation nicht sauberer als 25% hergestellt werden. Eine Bindung an molekulare Chaperone aufgrund schlechter Faltung erscheint unwahrscheinlich, da das Enzym gute DNA-Bindungs- und -Spalteigenschaften aufwies. Durch die Mutation an der Oberfläche können Affinitäten zu anderen Proteinen entstanden sein. Dies ist durch einen einzelnen Aminosäureaustausch unwahrscheinlich jedoch möglich.

Durch die Umkehr eines ionischen Kontakts in Form einer Salzbrücke in eine elektrostatische Abstoßung ist die Stabilität des dimeren Enzyms nicht beeinträchtigt worden. Es konnten in keiner Weise Ähnlichkeiten zu den Mutationen der Position Leu158 ermittelt werden. Die Austausche der Aminosäuren wurden gut toleriert, so

daß davon ausgegangen werden muß, daß diese Ladungen hauptsächlich für die Löslichkeit des Enzyms von Bedeutung sind und keine strukturellen Aufgaben erfüllen. Dafür spricht auch, daß auf der gesamten Enzymoberfläche nur zwei Paare von Aminosäuren gefunden wurden, welche die beiden Untereinheiten überspannen. Allerdings wies die Doppelmutante L158D-K226C<sub>His6</sub> (siehe unten) eine erhöhte Stabilität im Vergleich zur Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> auf. Möglicherweise kann das Cystein einen Kontakt mit der anderen Untereinheit aufbauen, der für Lysin nicht zugänglich ist.

Untersuchungen zur Bedeutung von Oberflächenladungen auf Proteinoberflächen weisen in die gleiche Richtung. Zum Beispiel konnte für Barnase durch zielgerichtete Mutagenese gezeigt werden, daß die untersuchte Salzbrücke für die Proteinstabilität nicht erforderlich ist [Sali *et al.*, 1991].

Durch die Daten erscheint insgesamt gesichert, daß der Kontakt zwischen den Untereinheiten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* hauptsächlich durch die hydrophobe Interaktionsfläche bewirkt wird. Eine Destabilisierung in diesem Bereich führt zu einem Verlust des Kontaktes und so zu einem monomeren Enzym, während die Zerstörung von Salzbrücken auf der Oberfläche zwischen den Untereinheiten auf die Proteinstabilität keinen Einfluß hat.

Für eine *Cross link*-Reaktion zwischen Untereinheiten eignen sich neben den oben beschriebenen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche auch die Positionen 158 und 230 (Abstand 8,7Å), die sich in der Interaktionsfläche des Dimers befinden.

Wie erwartet, wiesen die Cystein-Mutanten dieser Positionen keine signifikanten Unterschiede in DNA-Bindung und -Spaltung im Vergleich zu den korrespondierenden Lysin- beziehungsweise Aspartataustauschen und zum wt-Enzym auf. Mit Ausnahme der Mutante I230C<sub>His6</sub>, die eine um den Faktor 100 verringerte Spaltaktivität aufwies, waren die spezifischen Aktivitäten um weniger als den Faktor zehn schlechter als beim wt-Enzym. In analoger Weise verhielten sich die Bindungskonstanten zueinander, wobei hier für die oben erwähnte Mutante keine verminderte Bindung dokumentiert werden konnte.

Für die Mutante D74C<sub>His6</sub> wurde im Rohaufschluß Spaltaktivität detektiert, jedoch wurde keine ausreichende Proteinmenge für eine Aufreinigung exprimiert. Es erscheint wahrscheinlich, daß das Enzym in seiner Faltung gestört ist und daher schon intrazellulär abgebaut wurde.

Die *Cross link*-Experimente mit den Cystein-Einzelmutanten wurden nach Dialyse der zu untersuchenden Mutanten gegen einen Puffer, der keine reduzierenden Reagenzien wie Dithiothreitol enthielt, ausgeführt. In ausführlichen Experimenten wurden die Versuchsparameter Reaktionszeit und -temperatur, molare Verhältnisse der Mutanten zum *Cross link*-Reagenz und das Reaktionsvolumen variiert. Die Ausbeute an *Cross link*-Produkt war in jedem Fall gering, häufig konnten gar keine Reaktions-

produkte detektiert werden. Durch Erhöhung der Reaktionszeit oder des Zusatzes an BMH konnte keine Steigerung in der Ausbeute erzielt werden.

Es erscheint denkbar, daß die *Cross link*-Reaktion nur in einem Heterodimer zu beobachten ist. Die biochemische Charakterisierung dieser Mutanten hat jedoch gezeigt, daß sie in keiner Weise in ihrem Monomer/Dimer-Gleichgewicht gestört sind, so daß ein Austausch der Untereinheiten nur sehr langsam geschieht. In Verbindung mit Untersuchungen der Mutantenpositionen 158 und 230 wurden Doppelmutanten aus den entsprechenden Einzelmutanten hergestellt. Dabei wurden die Paare danach ausgewählt, ob eine Verbindung zu einem Heterodimer nachgewiesen wurde [Vennekohl, 1996]. So ergaben sich folgende Kombinationen: L158K-K226C<sub>His6</sub> mit I230D-D269C<sub>His6</sub> sowie L158D-K226C<sub>His6</sub> mit I230K-D269C<sub>His6</sub>.

Für die Doppelmutanten gilt in analoger Weise wie für die Einzelmutanten, daß die Aminosäureaustausche in ausreichend großer Entfernung zum katalytischen Zentrum liegen. Mit Ausnahme der Mutante L158D-K226C<sub>His6</sub> zeigten sich nur geringe Abweichungen im DNA-Bindungs- oder -Spaltverhalten. Diese Mutante allerdings wich von der Einzelmutante L158D<sub>His6</sub> ab, die nur unspezifische Nukleaseaktivität zeigte. Mit einer spezifischen Spaltaktivität von  $1,0 \cdot 10^4 \text{U/mg}$  und einer spezifischen Bindungskonstante von  $6,0 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$  war die Doppelmutante nur etwa um den Faktor 300 schlechter als das wt-Enzym. Es waren jedoch deutlich monomere Proteinanteile vorhanden, da schon zu Beginn der Spaltung unspezifische Nukleaseaktivität auftritt. Insgesamt jedoch scheint die Destabilisierung des Homodimers durch die Mutation L158D mit dem Austausch K226C reduziert worden zu sein. Unter Umständen ist eine Interaktion des Cysteins mit der anderen Untereinheit möglich, die durch das Lysin, das auf der Proteinoberfläche mit großer Wahrscheinlichkeit geladen ist, nicht eingegangen werden kann, und die das dimere Enzym genügend stabilisiert, um eine spezifische Spaltung zu detektieren.

Die *Cross link*-Experimente mit den Cystein-Doppelmutanten verliefen jedoch in keiner Weise erfolgreicher als für die Einzelmutanten, es konnte kein Produkt erzeugt werden.

Die Tatsache, daß sich die *Cross link*-Ergebnisse nicht zuverlässig reproduzieren ließen und die entstehenden Banden unabhängig von den Reaktionsbedingungen erschienen, lassen auf ein allgemeines Problem in der Reaktionsführung schließen. Das *Cross link*-Reagenz BMH ist auf zwei Thiolgruppen angewiesen, mit denen es reagieren kann. Findet eine Reaktion nicht statt, kann dies mehrere Ursachen haben:

- (1) Das *Cross link*-Reagenz BMH ist instabil oder reaktionsunfähig.
- (2) Der Reaktionspuffer oder die Bedingungen sind ungeeignet.
- (3) Die Cysteine liegen nicht in der reduzierten, reaktiven Form vor.
- (4) Der Abstand der reaktiven Thiolgruppen ist nicht mit dem *Cross link*-Reagenz kompatibel.
- (5) Die Thiolgruppen sind nicht für das *Cross link*-Reagenz zugänglich.

(ad 1) Das *Cross link*-Reagenz BMH ist hydrolyseempfindlich und soll nach Herstellerangaben unter Schutzgasatmosphäre aufbewahrt werden. Dieses war nicht möglich, aber die Lagerung fand über Kalziumchlorid statt und die Expositionszeit an Luft wurde möglichst kurz gehalten. Verdünnungen wurden vor den Experimenten frisch angesetzt. Um auszuschließen, daß nach kurzer Lebensdauer von BMH in der wäßrigen Reaktionslösung das Reagenz verbraucht ist, wurden die erforderlichen Mengen BMH auch schrittweise zugeführt. Es wurden alle Vorkehrungen für die Stabilität von BMH getroffen, trotzdem waren keine Unterschiede in der Ausbeute an *Cross link*-Produkt zu erreichen.

(ad 2) Die Reaktion wurde in einem DTT-freien Puffer ausgeführt, der zur Stabilisierung der Mutanten 300mM NaCl enthielt. Zusätzlich wurden 10mM EDTA zugesetzt, die laut Herstellerangaben eine vorzeitige Oxidation von Thiolgruppen verlangsamt. Reaktionen von Bismaleimidoalkanen wurden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in einem ähnlichen Puffersystem (20mM Tris/HCl pH7,0/50mM NaCl) mit einer Ausbeute von 60-80% *Cross link*-Produkt in der Literatur beschrieben [Schulze *et al.*, 1998]. Es ist unwahrscheinlich, daß der Unterschied in der Salzkonzentration einen so drastischen Effekt auf die *Cross link*-Ausbeute haben kann. Die Reaktionstemperatur erwies sich bei den Experimenten mit *EcoRV* als ausschlaggebend für die Ausbeute: Während bei 4°C nur etwa 20% *Cross link*-Produkt erzeugt wurden, stiegen die Ausbeuten auf 60-80% bei Raumtemperatur und sogar über 80% bei 37°C. Die Inkubationsdauer betrug hier drei bis fünf Minuten. Die Reaktionsbedingungen sind hinreichend ähnlich, um sie als Grund für das Scheitern der *Cross link*-Reaktion mit *EcoRI* auszuschließen.

(ad 3) Der Aufbewahrungspuffer der Mutanten enthält 0,1mM DTT, so daß eine Oxidation der Thiolgruppen effektiv verhindert wird. Es muß also davon ausgegangen werden, daß die Cysteine vor der Dialyse gegen den BMH-Reaktionspuffer in reduzierter Form vorlagen. In analoger Weise wurden die Präparationen von *EcoRV* behandelt, die ein gutes *Cross link*-Produkt ergaben [Schulze *et al.*, 1998].

(ad 4) Die Anzahl der erhaltenen *Cross link*-Produkte stimmte meist nicht mit der erwarteten Bandenzahl überein (vergleiche Tabelle 3.9). Die berechneten Abstände der  $\alpha$ -C-Atome beruhen auf dem *EcoRI*-DNA-Kokristall, in dem das Enzym an seine kognate Sequenz gebunden ist. Im freien Enzym oder im Komplex mit unspezifischer DNA ist es wahrscheinlich, daß sich eine etwas andere Anordnung der Polypeptidkette ergibt, die sich durch eine gewisse Flexibilität auszeichnet. Um dies auszuschließen, wurden die *Cross link*-Reaktionen in Gegenwart von DNA (spezifisch oder unspezifisch) ausgeführt. Allerdings zeigte sich auch hier keine Veränderung in der *Cross link*-Ausbeute.

Die Abstände sind auf eine *Cross link*-Verbindung zwischen den Untereinheiten ausgelegt. Die Mutanten wurden nach diesem Kriterium ausgewählt, also der räumlichen Nähe zur jeweils anderen Untereinheit. In den Experimenten jedoch schien es

keinen Unterschied zu machen, ob die Mutanten zuvor miteinander inkubiert wurden, um das Heterodimer zu bilden. Es ist möglich, daß die Inkubationszeit (über Nacht, 4°C) nicht ausreichte, um einen guten Austausch zu erreichen. Für die Inkubation der Doppelmutanten ist diese nach den vorherigen Erfahrungen ausreichend. Doch auch hier zeigte sich kein *Cross link*-Produkt. Das spricht dafür, daß es nicht die Abstände der reaktiven Gruppen waren, die eine effektive Verknüpfung verhinderten.

(ad 5) Da eine Veränderung der Reaktionspartner, die einen erfolgreichen *Cross link* verhindert hätte, ausgeschlossen werden kann, muß der Grund für das Mißlingen der *Cross link*-Reaktionen eine andere Ursache haben. Aufgrund des Hexahistidintags ist es möglich, daß die Enzyme in der Reaktionslösung Aggregate bilden, die einen effektiven *Cross link* dieser Positionen verhindern, oder abhängig von der Form der Zusammenballung unterschiedliche Ergebnisse liefern. Eine analoge Problematik ist für *EcoRV* nicht zu erwarten, da das Enzym eine wesentlich geringere natürliche Aggregationsneigung aufweist als *EcoRI*. Eine Erhöhung des Volumens der *EcoRI*-Reaktionsmischung, das die Aggregate auflösen sollte, war nicht erfolgreich, da die anschließende Fällungsreaktion der Proteine, um eine Analyse auf einem denaturierenden Gelsystem zu erlauben, nicht mit genügend großer Effizienz ausgeführt werden konnte, um ein eventuell auftretendes *Cross link*-Produkt zu detektieren.

Es ist auch denkbar, daß die Cysteine auf der Proteinoberfläche Kontakte eingehen, die eine *Cross link*-Reaktion erschweren. Bei *EcoRV* befanden sich die eingeführten Cysteine an der Spitze der DNA-umgreifenden Schleifen des Enzyms an der Position Thr222 [Schulze *et al.*, 1998]. In dieser exponierten Lage konnten keine Wechselwirkungen mit dem Enzymkörper eingegangen werden, und die Thiolgruppen müssen eine gute Zugänglichkeit aufweisen. Die Positionen 74 und 221 sowie 226 und 269, die bei *EcoRI* zu Cysteinen verändert wurden, befinden sich auf der Oberfläche des Enzyms, sind jedoch mehr in die Enzymstruktur eingebettet (vergleiche auch Abbildung 3.15). Dies bietet die Möglichkeit für eine Interaktion mit anderen Aminosäuren, so daß unter Umständen die Zugänglichkeit für das *Cross link*-Reagenz nicht gegeben war. Dafür spricht auch die erhöhte Stabilität der Doppelmutante L158D-K226C<sub>His6</sub>.

Abschließend ist nicht zu entscheiden, an welcher Stelle die *Cross link*-Reaktionen scheiterten. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Reaktionspartner (BMH und Thiolgruppen) durch Verfahrensfehler inaktiviert wurden, dennoch konnte kein *Cross link*-Produkt in befriedigender Menge hergestellt werden.

Unabhängig von der Entstehung der heterodimeren Enzyme ist eine Abtrennung von Homodimeren nötig. Bei der Koexpression von verschiedenen Untereinheiten in einer *E.coli*-Zelle entstehen Homo- und Heterodimere zu einem Verhältnis von 1:1:2. Um die gewünschten Moleküle aus diesem Gemisch zu isolieren, wurden die Untereinheiten mit verschiedenen Affinitätstags ausgestattet, die eine Aufreinigung über

beide Affinitätsmatrices erlauben. Beschrieben ist ein solches Verfahren für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* [Stahl *et al.*, 1996; Wende *et al.*, 1996]. Hier wurden in einem Drei-Plasmid-System zwei *ecoRV*-Gene zusammen mit der Methylase in einer Zelle exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die Plasmide mit den Endonukleasegenen trugen dabei den gleichen *Ori*, konnten aber aufgrund unterschiedlicher Resistenzgene auf den Plasmiden in den Zellen lange genug gehalten werden, um eine Expression zu ermöglichen. Die Untereinheiten der Restriktionsendonukleasen sind zum einen mit einem Hexahistidintag fusioniert, zum anderen mit der Glutathionbindenden Domäne der Glutathion-S-Transferase (GST), so daß eine Aufreinigung der Heterodimere über beide Säulenmaterialien möglich war.

Analog zu den Experimenten mit *EcoRV* wurde die Bildung von Heterodimeren von *EcoRI* durch Koexpression ausgeführt. Um jedoch das instabile Drei-Plasmid-System zu umgehen, wurden beide *ecoRI*-Gene (in Fusion mit dem Hexahistidintag und dem *StrepTag II*) gemeinsam in einer polycistronischen *Message* auf einem Plasmid codiert. Dabei war für jedes Gen die Shine Dalgarno-Sequenz erhalten geblieben, sie wurden jedoch nur von einem Promotor ( $P_L$ -Promotor) kontrolliert und von beiden Genen ein gemeinsames mRNA-Molekül hergestellt. Die Ausbeuten für die gewünschten Heterodimere lagen in der erwarteten Größenordnung von 50%.

Zunächst wurde die Konstruktion für zwei wt-Gene ausgeführt, um die Funktionalität des Systems zu überprüfen. Das entstehende Genprodukt (wt-*EcoRI*<sub>StrepII</sub>/wt-*EcoRI*<sub>His6</sub>) trägt zwei wt-Untereinheiten, die sich nur in ihrem Affinitätstag unterscheiden. Das Heterodimer wurde über zwei Affinitätsmatrices zur Homogenität aufgereinigt. Die Identität des Konstruktes wurde durch *Western blot* nachgewiesen. Es unterschied sich weder in seiner spezifischen Aktivität noch in der Bindungskonstante von den homodimeren wt-Enzymen.

Die Stabilität des Heterodimers war in keiner Weise eingeschränkt, jedoch im Gegensatz zu den Homodimeren kann der Austausch von Untereinheiten hier zu einer Veränderung der Proteine führen. Untersuchungen mit *EcoRV*, die eine vergleichbar stabile Interaktionsfläche zwischen den Untereinheiten aufweist, ergaben, daß kein detektierbarer Austausch innerhalb eines Jahres im glyzerinhaltigen Aufbewahrungspuffer oder bei Inkubation über eine Stunde bei 37°C stattfand [Stahl *et al.*, 1996]. Durch die Fusion mit der GST-Domäne erhöht sich das Molekulargewicht einer *EcoRV*-Untereinheit von 30kDa auf 55kDa. Eine Analyse der homodimeren Enzyme und des entsprechenden Heterodimers durch einen Gelretardations-Assay zeigte deutliche Unterschiede in der Verschiebung der Banden, die durch die verschiedenen Molekulargewichte hervorgerufen wurde. Im Heterodimer ergaben sich dabei keine Banden, die einem Homodimer entsprachen.

Vergleichbare Untersuchungen sind mit Heterodimeren von *EcoRI* nicht möglich, da es sich bei den Affinitätstags um Fusionsanteile handelt, die sich nur um zwei Aminosäurereste voneinander unterscheiden. Bei der Bestimmung der Bindungskon-

stante für das Enzym konnte daher im Gelretardations-Assay kein Unterschied im Laufverhalten der Protein-DNA-Komplexe festgestellt werden. Möglich ist eine Überprüfung der Integrität des Enzyms durch eine erneute Inkubation mit den Affinitätsmatrices, die bei einem unveränderten Heterodimer jedes Proteinmolekül binden sollten. Dieses aufwendige Analyseverfahren erschien nur wenige Monate nach der Präparation unangebracht, sollte jedoch für einen späteren Zeitpunkt vorgesehen werden. Insgesamt ist anzunehmen, daß eine Stabilität der Heterodimere hinreichend groß ist, um eine biochemische Charakterisierung zu ermöglichen.

Nach Etablieren der Methode wurden weitere Heterodimere konstruiert, die mutierte Untereinheiten mit einer wt-Untereinheit kombinierten. Die Mutante D91A<sub>His6</sub> war in der Lage, spezifisch DNA zu binden, konnte jedoch unter allen getesteten Versuchsbedingungen keine Katalyse mehr ausführen [Grabowski *et al.*, 1995]. Das Heterodimer wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub> wurde exprimiert und aufgereinigt, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht vollständig charakterisiert werden.

Eine Analyse der Spaltaktivität dieses Heterodimers zeigte eine drastische Reduktion der Spaltaktivität, während die DNA-Bindungskonstante derjenigen von wt-*EcoRI*<sub>StreptII</sub> und D91A<sub>His6</sub> entsprach. Durch Variation der Inkubationsbedingungen konnte bei pH8,8 eine im Vergleich zu pH7,5 gesteigerte Spaltaktivität auf pUC18 nachgewiesen werden. Durch die basische Umgebung ist eine unaktivierte Katalyse möglich, da die angreifende OH-Gruppe nicht generiert werden muß. So kann eine Störung im Enzym durch das umgebende basische Medium ausgeglichen werden [Jeltsch *et al.*, 1993; Rosati, 1999].

Die sehr geringe Spaltaktivität von wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub> auch über den Zeitpunkt von 23h bei 37°C ist ein Beweis für die Integrität der Enzympräparation, da auch die kleinste Menge an homodimerem wt-Enzym eine größere Spaltaktivität aufweisen würde.

Diese starke Beeinflussung des gesamten Enzyms durch nur ein inaktives katalytisches Zentrum war unerwartet. Bei der Spaltung von asymmetrischen Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, daß die Spaltgeschwindigkeiten des Enzyms auf den beiden Strängen nicht identisch waren, und derjenige Strang durch eine Untereinheit gespalten wurde, zu dem eine geringere Anzahl von Kontakten ausgebildet wurde [Thielking *et al.*, 1990]. Dies wurde als eine Kopplung der Erkennung durch die Untereinheiten interpretiert, wobei jedoch für die katalytischen Zentren aufgrund der unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten für die Stränge keine Kooperation angenommen wurde.

Die Interaktionen der Untereinheiten sind jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen an keine Richtung geknüpft: Während die Übermittlung von Signalen von der Erkennung zur Katalyse schon lange bekannt ist [Jeltsch *et al.*, 1993a], muß jetzt auch von einem Rückfluß der Informationen ausgegangen werden, da in einem Enzym mit einer inaktiven Untereinheit auch die andere nicht mehr effektiv zu spalten vermag. Durch die Mutation des Asp91 nach Alanin ist die Magnesiumbindungsstelle zerstört

worden, so daß die Aminosäuren des katalytischen Zentrums mit hoher Wahrscheinlichkeit eine andere Konformation als im wt-Enzym einnehmen. In unmittelbarer Umgebung der Position 91 befinden sich die Aminosäuren Asn85, Ser87 und Lys89, welche Phosphatkontakte zur DNA ausbilden, so daß hier eine Beeinflussung denkbar ist. Auch eine Wirkung auf die Aminosäuren des  $\beta$ 3-Strangs ist wahrscheinlich, der sich der Aminosäure 91 gegenüber befindet. Er trägt neben Glu111 und Lys113 des aktiven Zentrums die Aminosäure Gln115, der eine wichtige Rolle in der Kopplung von Erkennung zur Katalyse zugesprochen wurde. Durch das Verhalten des Heterodimers wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub> ist es wahrscheinlich geworden, daß auch die schlechte Positionierung von Gln115 zu einer Rückkopplung zur *Extended chain* führt, die für die spezifische Erkennung des Enzyms entscheidend ist. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, in welcher konformationellen Struktur die Mutante D91A<sub>His6</sub> vorliegt. Die DNA-Bindungsfähigkeit des Enzyms war nicht verändert, doch die Auswirkungen des fehlenden Magnesiums beschränken sich offenbar nicht auf ein inaktives katalytisches Zentrum, sondern sind weitergehend.

Im Gegensatz zu *EcoRI* konnte für *EcoRV* mit einem analogen Heterodimer (wt/D90A) die Unabhängigkeit der katalytischen Zentren bewiesen werden. Das Heterodimer wies insgesamt nur eine um den Faktor zwei reduzierte Spaltaktivität auf und zeigte auf Plasmid-DNA eine Akkumulation von offen-zirkulärem Substrat, was einer Spaltung eines Einzelstrangs im doppelsträngigen Plasmid entsprach [Wende *et al.*, 1996]. Zusätzlich konnte durch weitere Kombinationen von mutierten Untereinheiten gezeigt werden, daß diejenige Untereinheit, die das Substrat zu erkennen vermochte, es auch spaltete [Stahl *et al.*, 1996].

Die Ergebnisse mit wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub> lassen für *EcoRI* nur den Schluß zu, daß die Untereinheiten im Gegensatz zu *EcoRV* nicht nur bei der Bindung des Substrates kooperieren, sondern auch in der Katalyse voneinander abhängig sind. Durch die Kopplung der DNA-Erkennung an die Katalyse kann nur dasjenige Substrat gespalten werden, welches von dem Enzym vollständig erkannt wird. Zusätzlich muß jetzt davon ausgegangen werden, daß auch durch ein inaktives katalytisches Zentrum eine Rückkopplung im Enzym erzeugt wird, die eine effektive Spaltung verhindert. Die dimere Restriktionsendonuklease *EcoRI* handelt daher als katalytische Einheit.

Zur vollständigen Charakterisierung dieser interessanten Mutanten können Spaltungen zum Beispiel auf asymmetrischen Oligonukleotiden ausgeführt werden. Durch die geringe Spaltgeschwindigkeit sind die Einsatzmöglichkeiten aufgrund der geringen Konzentration der vorliegenden Präparation jedoch begrenzt. Eine erneute Präparation ist daher unumgänglich.

Die Konstruktion asymmetrischer Enzyme eröffnet, gerade im Licht der ancharakterisierten Mutante wt<sub>StreptII</sub>/D91A<sub>His6</sub>, faszinierende Möglichkeiten für das Verständnis der Funktionsweise des Enzyms. Dabei ist die Kombination einer bindungsinaktiven

Mutante mit einer wt-Untereinheit ebenso denkbar wie die Verknüpfung zweier mutierter Untereinheiten. Auch eine Analyse der Stabilität des Heterodimers mit L158D<sub>His6</sub>/I230K<sub>His6</sub>, das bisher nur mit unbekannter Ausbeute *in vitro* hergestellt werden konnte, ist nun möglich.

### 4.3 DNA-Bindungseigenschaften der *Extended chain*-Peptide

Als homodimeres Enzym ist die Restriktionsendonuklease *EcoRI* ein Protein hoher Symmetrie. Sie erkennt eine palindrome DNA-Sequenz, deren Punktsymmetrie sich in den Kontakten durch die beiden Untereinheiten widerspiegelt (siehe Abbildung 4.1). Dabei geht eine Großzahl der Bindungen von der *Extended chain* aus, die von den Aminosäuren Lys130 bis Arg145 durch die große Grube der DNA läuft, die Arginine der Untereinheiten kommen sich dabei auf eine Entfernung von 6,1Å nahe (siehe Abbildung 4.3).

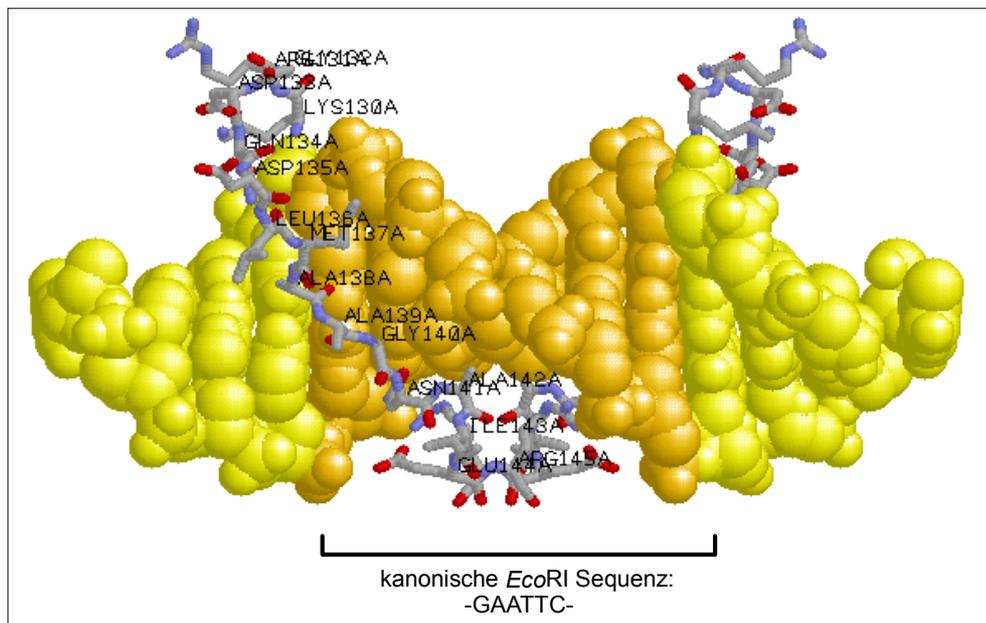


Abb. 4.3: Symmetrischer Verlauf der *Extended chain*-Motive durch die große Grube der DNA

Die *Extended chain*-Motive der beiden Untereinheiten bilden eine Art "Schere", zwischen deren Schneiden die DNA eingebettet wird. Es wurde gezeigt, daß ein Peptid, welches die Aminosäuren Met137 bis Arg145 enthält, in der Lage ist, die DNA spezifisch zu erkennen [Jeltsch *et al.*, 1995b]. In einer Reihe von Experimenten (Nitrozellulose-Filterbindung, CD-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie und Fluoreszenz-

messungen) konnte allein durch die Kompetition des Peptids mit dem Enzym *EcoRI* eine Bindungskonstante ermittelt werden. Für ein Oligonukleotid von 13bp Länge ergab sich bei Zusatz von 100µM Peptid  $\alpha 4$  (Sequenz WDGMAAGNAIER) eine Hemmung um den Faktor 1,4 für die Spaltung durch *EcoRI*. Auf Plasmid-DNA wurde durch Zusatz von Peptid die Verlangsamung der Spaltung verschiedener Enzyme gemessen. Dabei wurden gerade die Endonukleasen gehemmt, deren Erkennungssequenz einige Basen mit der *EcoRI*-Sequenz überlappten. Insgesamt wurde aus den Ergebnissen die Bindungskonstante zu  $3 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$  geschätzt.

Der beobachtete Schutz der DNA durch das Peptid vor einer enzymatischen Spaltung kann nur durch vollständige Bedeckung der Erkennungssequenz erreicht werden. Daher muß das monodentate Peptid auf der DNA dimerisieren. In Analogie zur Struktur der *Extended chain*-Motive im Enzym erscheint es sinnvoll, die Peptidarme zu einem solchen bidentaten Arrangement zu verbinden. Um dies mit einem *Linker* zu erreichen, muß es sich um Diamino-Verbindungen handeln, die für jeden Peptidarm eine Aminogruppe zum Knüpfen von Peptidbindungen zur Verfügung stellt. Aufgrund des Abstandes der Aminosäuren Arg145 von 6,1Å kamen unterschiedliche Verbindungen in Frage, die sich in ihrer Länge jeweils um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe voneinander unterscheiden: Diaminopropionsäure (4,3Å), Diaminobuttersäure (5,8Å), Ornithin (7,3Å) oder Lysin (8,8Å). In der Kristallstruktur ist ein Kontakt von Arg145 und Glu144 zwischen den Untereinheiten zu erkennen, der für die Ausrichtung der *Extended chain*-Motive verantwortlich sein kann. Daher erscheint Arg145 prädestiniert für eine Verbindung der Peptidarme, so daß in Verbindung mit dem nachfolgenden Glutamat über die gebildete Wasserstoffbrücke eine Orientierung der Peptidarme erfolgen kann.

Wenn neben einer Variation in der Verknüpfung noch eine Veränderung in der Aminosäuresequenz vorgenommen werden soll, steigt die Anzahl der zu untersuchenden Peptide schnell an. Die kombinatorische Analyse sehr verschiedener Peptidsequenzen schafft die Möglichkeit, eine große Anzahl von Sequenzen in einem einzigen Experiment zu untersuchen. Mithilfe von Pipettierrobotern können so bis zu 2000 unterschiedliche Peptidsequenzen auf einer Fläche von 8x12cm synthetisiert werden. Peptidbibliotheken werden vor allem für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen genutzt, zum Beispiel für die Verbesserung einer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung oder die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand. Für das Restriktionsenzym *EcoRII* wurden mit einer Bibliothek überlappender Dodecapeptide der gesamten Endonuklease durch die Bindung radioaktiv markierter spezifischer Oligonukleotide zwei getrennte DNA-Bindungsdomänen identifiziert [Reuter *et al.*, 1999].

Ein Einsatz der kombinatorischen Möglichkeiten für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist leicht vorstellbar. Durch die Variation des DNA-Bindungsmotivs, vor allem der *Extended chain*, kann die Auswirkung einer Vielzahl von Mutationen in einem Experiment untersucht werden, und die im Vergleich aufwendige Mutagenese entfällt zunächst und kann für interessant erscheinende Mutanten gegebenenfalls nachgeholt

werden. Außer der Analyse der bestehenden Bindungspartner ist mit einer randomisierten Bibliothek auch eine Variation in den Oligonukleotiden denkbar, um nach Bindungsaktivitäten für Sequenzen zu suchen, die von GAATTC abweichen. Im Hinblick auf rationelles Protein-Design zur Erzeugung einer veränderten Spezifität des Enzyms ist dies eine faszinierende Möglichkeit, zunächst ein Bindungsmodul für Spezifitätsmutanten zu erzeugen, das dann in das Protein zurückversetzt werden könnte.

Durch die *Spot-Synthesis*-Methode wurden 425 unterschiedliche Peptidsequenzen hergestellt [Frank, 1992]. Da es sich um ein völlig unerprobtes Verfahren der Untersuchung von Protein/DNA-Wechselwirkungen handelt, ist eine Vorhersage über die benötigte Länge der immobilisierten Peptide nicht möglich. Daher wurden im Einklang mit der Kristallstruktur die Sequenz von Arg145 bis Met137, dem eigentlichen *Extended chain*-Motiv (neun Aminosäuren: R<sup>145</sup>EIANGAAM<sup>137</sup>), sukzessive bis zur Aminosäure Lys130 verlängert (16 Aminosäuren: R<sup>145</sup>EIANGAAM<sup>137</sup>LDQDGRK<sup>130</sup>). Darüber hinaus erschien eine Verlängerung nicht sinnvoll, da sich der in der Kristallstruktur anschließende *Inner arm* wieder von der DNA entfernt und von seinen Aminosäuren keine direkten DNA-Kontakte mehr ausgebildet werden.

Ausgehend von einer guten Bindung durch die native *Extended chain* wurden Sequenzen für die anderen Peptide gewählt, die eine Schwächung dieser Bindung bewirken sollten. Dabei lag der Schwerpunkt auf solchen Mutationen, deren Auswirkungen schon durch klassische Mutagenese von *EcoRI* charakterisiert worden sind.

Die Detektion der Oligonukleotidbindung erfolgte durch eine Biotinmarkierung, die mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen wurde. Überraschenderweise kam es bereits ohne den Zusatz biotinylierter DNA in unterschiedlichen Inkubationspuffern zu einer Wechselwirkung des Konjugats mit den immobilisierten Peptiden. In der überwiegenden Anzahl der Anwendungen solcher Bibliotheken handelt es sich um Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Die Bibliothek wird dann mit einem *Blocking*-Puffer behandelt (zum Beispiel auf Casein-Basis), der die nicht besetzten Bindungsplätze sättigt, um eine unspezifische Interaktion des Konjugats mit der Membran zu verhindern. Die Interaktion des Konjugats wurde durch den Zusatz in diesem Fall nicht beeinflusst, die Farbreaktion einiger *Spots* sogar gefördert. Daher wurde eine Reihe von Puffern getestet, um die Hintergrundfärbung der Membran zu minimieren.

In einigen einführenden Messungen wurde die Reproduzierbarkeit der Färbungen untersucht. Unterschiedliche Einstellungen im Dokumentationssystem (*Scanner* und Auswertesoftware) führten nur zu geringen Schwankungen in den Werten (bis 2%), so daß eine Fehlerquelle auf Seiten der Bildverarbeitung ausgeschlossen wurde. Mit der Auswertung der zweiten Membran, bei der die Referenzpunkte mit in das Raster aufgenommen wurden, wurde eine Auswertung mehrerer Referenzpunkte zueinander möglich. Dabei zeigte sich deutlich, daß die Verhältnisse der Farbintensitäten dieser Punkte stark von den Inkubationsbedingungen abhingen (vergleiche Abbildung 3.29).

Während innerhalb einer Messung zu verschiedenen Zeiten annähernd gleiche Verhältnisse vorlagen, waren selbst zwischen Messungen unter gleichen Bedingungen Unterschiede sichtbar. Der Zusatz von Oligonukleotid während der Inkubation führte zu einer gravierenden Verschiebung dieser Verhältnisse, die auch durch den Zusatz unspezifischer DNA nicht angeglichen werden konnten. Damit war der Vergleich zweier quantitativer Auswertungen im Bezug auf einen der Biotin-Punkte nicht zulässig, und daher sind für beide Membranen nur qualitative Aussagen über das Bindungsverhalten der immobilisierten Peptide möglich.

Bei der Betrachtung der Farbreaktionen für beide Membranen war offensichtlich, daß sich das Muster alle vier Reihen wiederholte. Es handelte sich dabei jeweils um die verschiedenen *Linkermoleküle*, mit denen die bidentaten Peptide verknüpft wurden. Da die Membran keine monodentaten Peptide enthielt, ist eine Aussage über die Relevanz der Verknüpfung nicht möglich.

Im Vergleich der Experimente mit und ohne Oligonukleotid fällt auf, daß sich ein sehr ähnliches Muster in der Farbreaktion ergibt. Offenbar wurde das Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat von den gleichen Peptidsequenzen gebunden wie die Oligonukleotide. Eine Beeinflussung der Oligonukleotidbindung durch das Konjugat erscheint jedoch unwahrscheinlich, da nach der Bindung zunächst mehrere Male gewaschen wurde, ehe das Konjugat mit der Membran inkubiert wurde.

Die Inkubation der ersten Membran mit einem Oligonukleotid führte zu höheren Farbintensitäten an einigen *Spots* der Membran. Dieses Verhalten betraf vor allem die *Spots*, die am Ende ihres Peptids ein Arginin (Position 131 in *EcoRI*) oder ein Lysin (Position 130 in *EcoRI*) trugen, so daß durch die positive Ladung die DNA-Bindung gefördert wurde. Weiterhin fand eine starke Farbreaktion an denjenigen *Spots* statt, an denen die negativ geladene Aminosäure Aspartat (im Kokristall Asp135) gegen ein positiv geladenes Lysin ausgetauscht war.

Die Steigerung der Farbreaktion durch den Zusatz von Oligonukleotid war nur sehr gering. Im Vergleich zwischen den Oligonukleotiden war keine Aussage über eine spezifische Bindung der DNA möglich, da beide Oligonukleotide das gleiche Muster erzeugten. Auch nach Zusatz degradiertes Heringssperma-DNA zur Absättigung unspezifischer Bindungsplätze konnte keine spezifische Bindung detektiert werden.

Problematisch im gesamten Ansatz der Peptidbibliothek war neben der Vergleichbarkeit verschiedener Messungen die offenbar geringe DNA-Affinität der immobilisierten Peptide. Für die Durchführung der Farbreaktion mußten in mehreren Waschschritten die überschüssigen Oligonukleotidmoleküle entfernt werden, die nicht von Peptiden gehalten wurden. Bei einer geringen Bindungskonstante allerdings werden die gebundenen Oligonukleotide während der Waschschritte abdissoziieren. Eine Einstellung des Gleichgewichts zwischen schwach gebundenem Molekül und dem Oligonukleotid-freien Waschpuffer wird schnell erfolgen, so daß die eigentliche Farbreaktion nur noch mit wenigen Molekülen möglich war. Eine Verringerung der Anzahl der

Waschschritte und ihre Verkürzung erbrachte keine Steigerung in der Anfärbarkeit der *Spots*. Schließlich wurde in einer Vorinkubation von Oligonukleotid und dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat ein Vorkomplex gebildet, mit dem die Membran anschließend inkubiert wurde. Auch dieser Schritt führte zu keiner Erhöhung der detektierbaren Oligonukleotidbindung an die Bibliothek.

Auf der Membran A wurden, ausgehend von einer starken Bindungsfähigkeit der nativen *Extended chain*, überwiegend bindungsschwächende Mutationen in die Sequenzen eingebracht. Für die Membran B wurde die gegenteilige Strategie gewählt, eine Stärkung der DNA-Bindung durch gezielte Attraktion. Eine Verbesserung der Bindungsfähigkeit ist unter Umständen durch eine größere Flexibilität innerhalb und zwischen den Peptidarmen zu erreichen. Daher wurden für die Synthese auf der zweiten Membran weitere Anfangspunkte für die Verzweigung gewählt. Neben Arg145 befinden sich auch die Aminosäuren His147 und Lys148 in einer Position, die eine Verknüpfung der Peptide sinnvoll macht.

Für die Ausrichtung und Stabilisierung der *Extended chain* im Enzym scheinen die Aminosäuren Arg145 und Glu144 durch die von ihnen gebildete Salzbrücke entscheidend beizutragen. Gleichzeitig bringt das Glutamat jedoch eine negative Ladung mit, die in die Nähe der DNA gelangt. Ein Austausch gegen Glutamin sollte diese Stabilisierung nicht wesentlich stören, weist aber die negative Ladung nicht auf. Die Proteinvariante E144Q zeigte insgesamt eine um den Faktor 100 geringere Spaltaktivität als das wt-Enzym [Wolfes *et al.*, 1986].

Neben der wt-Sequenz wurden auch die *Spots* mit der Mutation Asp135Lys wieder aufgenommen, um eine Vergleichbarkeit zwischen beiden Membranen zu erreichen. Die Messungen wurden im gleichen Bindungspuffer wie bei Membran A verwendet.

Während sich im Vergleich zwischen den *Linkern* analog zur Membran A kein Unterschied ergab, hatte der Verzweigungspunkt einen großen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit der Peptide. Durch die Einführung einer weiteren positiven Ladung (Lys148) war eine stärkere DNA-Attraktion zu verzeichnen. Zusätzlich erbrachte der Austausch von Glutamat gegen Glutamin eine Verbesserung der Bindungseigenschaften. Auffällig war, daß die Farbreaktion an *Spots* mit der Mutation Asp135Lys und dem Verzweigungspunkt Arg145 nicht mehr so ausgeprägt erschien wie auf der Membran A.

Aufgrund dieser Beobachtungen ergab sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Ladung des Peptids und seiner DNA-Bindungsfähigkeit: Je höher die positive Nettoladung, desto eher wurde DNA gebunden. Allerdings ergab sich dadurch keine Spezifität der Bindung. Im Enzym befinden sich die Aminosäuren Arg131 und Lys130 an der Spitze des *Inner arms*. Sie könnten hier für die initiale aber unspezifische Bindung der DNA verantwortlich sein, die durch Ladungsattraktion entsteht, anschließend kann die DNA durch ein Öffnen der Armstrukturen umschlossen werden. Erst dann

erfolgt die Ausbildung von sequenzabhängigen Kontakten, die zur Spezifität des Enzyms führen. Befindet sich das Oligonukleotid zwischen den Peptidarmen, so besteht kein Grund zur Annahme, daß die Kontakte hier nicht ausgebildet werden sollten. Daher ist anzunehmen, daß die DNA nicht in diese Position gelangen kann und die Bindung auf der Oberfläche der immobilisierten Peptide stattfindet. Es ist vorstellbar, daß durch die hohe Anzahl Peptide auf geringer Fläche eine Behinderung zwischen den Armen auftrat, die eine effektive Bindung verhinderte. Dafür spricht, daß gerade diejenigen Peptide, die eine positive Ladung am Ende ihrer Sequenz trugen, eine starke Farbreaktion ergaben. Durch die Bindung von DNA könnten abstoßende Ladungen der Peptide ausgeglichen werden.

Denkbar ist auch eine Interaktion der Peptidarme untereinander, die eine Bindung an DNA nicht begünstigt. Durch hydrophobe Kontakte zwischen den Armen zum Beispiel im Bereich Met137-Ala138-Ala139-Gly140 könnte eine Öffnung der Arme zum hydrophilen Medium ungünstig sein.

Im Vergleich der Farbreaktionen der Zufallssequenzen zu den *Spots* im Raster ist jedoch eine klare Bevorzugung für die geordneten Sequenzen festzustellen. Obwohl diese randomisierten Peptide aus den gleichen Aminosäuren bestehen, weisen sie unter keiner der Testbedingungen eine DNA-Bindung auf. Daher muß von einer Sequenzabhängigkeit der DNA-Bindung ausgegangen werden, selbst wenn sie durch die nachfolgende Farbreaktion keine Unterschiede in der DNA-Sequenz ergibt. Es erscheint möglich, daß die ausgeprägte Spezifität dieser Aminosäuren nur im Enzymkontext voll zum Tragen kommt.

Mit einer anderen Detektionsmethode, die nicht auf eine starke Bindung angewiesen ist, ist unter Umständen die schwache Bindung der immobilisierten Peptide an DNA besser meßbar. Ohne aufwendige Waschschriffe sollte die Bestimmung der Bindung *in situ* erfolgen. Dazu eignen sich zum Beispiel Reagenzien, die zu einem Förster-Transfer in der Lage sind.

Trotz der phantastischen Möglichkeiten, die eine Peptidbibliothek für die Analyse von Teileigenschaften des Enzyms bot, wurden die Versuche eingestellt, da zwischen den einzelnen Experimenten keine Vergleichbarkeit erreicht werden konnte. Auch zwischen beiden Membranen konnten keine Vergleiche gezogen werden, da identische Sequenzen auf beiden Membranen unterschiedliche Signale erzeugten.

Anwendung gefunden hat diese Methode in der Identifizierung der DNA-Bindungsdomäne der Restriktionsendonuklease *EcoRII* [Reuter *et al.*, 1999], für die DNA-Bindungsmotiv KXRXXK identifiziert wurde. In einer Substitutionsanalyse, also dem systematischen Austausch dieser konservierten Aminosäuren, konnte eine signifikante Reduktion in der Bindungskapazität nachgewiesen werden. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist es nicht überraschend, daß eine Reduktion der positiven Ladung zu einer Verminderung der Bindungsfähigkeit führte.

Die Experimente von Jeltsch *et al.* (1995b) wurden mit einem monodentaten Peptid in Lösung ausgeführt, das neben den Aminosäuren der *Extended chain* noch zusätzliche Aminosäuren aufwies (vergleiche Abbildung 3.33), um zum einen die Löslichkeit zu erhöhen und zum anderen Fluoreszenzmessungen zu ermöglichen. Der Einsatz beider Komponenten (Peptid und DNA) in löslicher Form erlaubt den Einsatz weit gestreuter Konzentrationsverhältnisse.

Um den Ansatz der Peptidverzweigung auf dieser Ebene zu testen, wurde eine Auswahl als freie Peptide synthetisiert und auf ihre DNA-Bindungseigenschaften untersucht. Gewählt wurden für diesen Zweck der kürzeste (Diaminopropionsäure, DAP, C1) und der längste *Linker* (Lysin, C4) in Verbindung mit den drei zuvor vorgestellten Aminosäuren für die Verzweigung. Weiterhin wurden die Sequenzen nur bis zum Met137 fortgeführt, da im DNA-Kokristall zu sehen ist, daß diese Aminosäuren den Hauptanteil der Kontakte ausbilden.

Die sechs Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen gemeinsam mit Plasmid-DNA vor inkubiert, um gegebenenfalls spezifische Bindung zu gestatten, und die Reaktion durch Zugabe einer Restriktionsendonuklease gestartet. Auf diese Weise wurden die Peptide in steigender Konzentration auf ihre hemmende Wirkung zunächst für *EcoRI* auf dem Plasmid pACYC184 untersucht, das nur eine *EcoRI*-Erkennungssequenz trägt. Dabei konnte eine Verlangsamung der Spaltung in Gegenwart der Peptide Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> festgestellt werden. Für den gleichen Effekt in der Hemmung (Faktor 16) war ein Einsatz von 0,2mM Arg145<sub>C1</sub> im Gegensatz zu 0,8mM Arg145<sub>C4</sub> notwendig. Für die Peptide der Anfänge His147 und Lys148 konnte bis zu einer Konzentration von 0,5mM Peptid keine Hemmung der *EcoRI*-Spaltung erreicht werden.

Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung der Peptide wurde ein analoger Versuch mit *BspEI* ausgeführt. Diese Endonuklease besitzt auf pACYC184 zwei Spaltstellen, eine davon überlappt mit der *EcoRI*-Erkennungssequenz, sollte also von den Peptiden gehemmt werden, die andere befindet sich in beliebiger Umgebung, und sollte daher nicht behindert werden. Um eine Unterscheidung beider Sequenzen zu ermöglichen, wurde vorlinearisiertes Plasmid in die Spaltung eingesetzt. Bei der Spaltung des Substrats ohne Zusatz von Peptid zeigte *BspEI* eine Bevorzugung der Erkennungssequenz, die mit der *EcoRI*-Spaltstelle überlappend ist. Durch Zugabe der gleichen Konzentrationen an Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> wurde eine Hemmung der Spaltung der zu *EcoRI* überlappenden Erkennungssequenz ermittelt. Die Bevorzugung dieser Spaltstelle konnte nicht mehr festgestellt werden. Es konnte damit eine Sequenzspezifität der Peptide erwiesen werden.

Um eine genauere Bestimmung der Bindungskonstante dieser Peptide vorzunehmen, können *Single turn over*-Bedingungen gewählt werden. Durch die Ermittlung der Spaltaktivität auf Oligonukleotiden kann das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer DNA genauer eingestellt werden und zusätzlich ist ein Überschuß Enzym über

spezifische Spaltstellen möglich. Während der kurzen Reaktionszeiten kann die Restriktionsendonuklease alle freien kognaten Sequenzen spalten, so daß die Hemmung der Spaltung ein Maß für die Bindung des Peptids an diese Sequenz darstellt. Die Messung über längere Zeiträume erscheint nicht sinnvoll, da durch die schwachen Bindungskonstanten der Peptide eine Abdissoziation von der kognaten Sequenz leicht erfolgen kann, so daß diese dann für die Spaltung durch die Endonuklease zugänglich wären. Im Laufe der Zeit könnte so jede Sequenz gespalten werden. Daher kann für eine solche Bestimmung nur die Anfangsspaltgeschwindigkeit herangezogen werden.

Entscheidend für die Bestimmung der Bindungskonstante war der Bezug zur nicht gehemmten Spaltaktivität. In ausführlichen Experimenten wurde überprüft, daß die Anfangsspaltgeschwindigkeit einer Endonuklease, die aus einer Enzymverdünnung ermittelt wurden, nur geringen Schwankungen unterliegt. So ist sichergestellt, daß ein Rückgang der Spaltaktivität tatsächlich auf das Peptid und nicht auf Schwankungen im System zurückzuführen ist.

Für die Bestimmung einer Bindungskonstante eines Peptids wurden mindestens fünf Peptidkonzentrationen in Konkurrenz mit der Restriktionsendonuklease aus der gleichen Enzymverdünnung gemessen. Die Spaltungen durch *Hinfl*, *HpaII* und *XbaI* zeigten im Gegensatz zu den hochkonzentrierten Laborpräparationen von *EcoRI* und *EcoRV* generell eine geringere Reproduzierbarkeit und konnten oft aufgrund zu geringer Anfangsspaltung nicht in die Auswertung einbezogen werden.

Neben den oben erwähnten Peptiden wurden weitere für eine detailliertere Bestimmung des Bindungsverhaltens einer künstlich dimerisierten *Extended chain* hergestellt. Für den direkten Vergleich zu Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> wurde Arg145<sub>mono</sub> synthetisiert, das sich nicht von den Peptidarmen der bidentaten Peptide unterscheidet. Für alle gemessenen Enzyme ergab sich eine Steigerung in der Bindungskonstante für die bidentaten Peptide: Während Arg145<sub>mono</sub> in diesem Meßsystem für die Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *EcoRV* keine Bindung aufwies, konnte für die bidentaten Peptide eine Konstante von etwa  $10^4 \text{M}^{-1}$  ermittelt werden, also eine Steigerung um mindestens den Faktor 100, die deutlich über die Steigerung der Anzahl der Peptidarme durch den bidentaten Ansatz hinausgeht. Die Bindungskonstanten wurden für den *Linker* DAP (C1) etwas höher ermittelt, und es ist bei beiden bidentaten Peptiden eine leichte Präferenz für die *EcoRI*-Spaltstelle gegenüber jenen von *EcoRV* und *Hinfl* zu erkennen.

Die Peptide der Gruppe His147 unterschieden sich von den Peptiden der Gruppe Arg145 nur durch die Aminosäuren Ser146 und His147. Für beide Peptide wurde ein sehr ähnliche Bindungskonstante für die Erkennungssequenzen aller Enzyme ermittelt, eine etwas bessere Bindungskonstante wurde für den Lysin-*Linker* festgestellt.

Während auf den ersten Blick keine Unterscheidung der Bindungsfähigkeit der bidentaten Peptide der Gruppen Arg145 und His147 feststellbar schien, war in Gegenwart eines unspezifischen Oligonukleotids ein Unterschied zu detektieren: Die Bin-

dung für die Peptide Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> sank um den Faktor zehn, die Bindung der Peptide His147<sub>C1</sub> und His147<sub>C4</sub> dagegen blieb nahezu konstant. Diese Werte wurden mit der Restriktionsendonuklease *HpaII* ermittelt, deren Erkennungssequenz (CCGG) auf dem spezifischen Oligonukleotid mit dem G der kognaten *EcoRI*-Sequenz überlappte, während das unspezifische Oligonukleotid keine Sequenzen enthält, die Ähnlichkeit mit den von den Arg145-Peptiden gebundenen Sequenzen aufwiesen.

Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Bindung durch die Peptide mit dem Beginn bei His147 unspezifischer Natur ist, während die beiden bidentaten Peptide mit dem Anfang bei Arg145 in der Lage sind, zwischen den Sequenzen der Oligonukleotide zu unterscheiden. Die Spezifität ist jedoch im Vergleich zur Restriktionsendonuklease relaxiert, da die Unterschiede in der Bindung zwischen den Sequenzen GAATTC (*EcoRI*), GATATC (*EcoRV*) und GANTC (*Hinfl*) nicht zu erkennen sind. Es handelt sich daher um eine degenerierte Erkennungssequenz GAN(N)TC, die von diesen Peptiden mit einer Bindungskonstante um  $10^4\text{M}^{-1}$  erkannt wird.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Messungen auf Plasmid-DNA, bei denen nur durch die Peptide Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> eine Hemmung der *EcoRI*-Spaltung hervorgerufen werden konnte. Die Peptide His147<sub>C1</sub> und His147<sub>C4</sub> konnten in den angebotenen Konzentrationen keine Hemmung der Spaltung der kognaten Sequenz erzeugen, da sie für die unspezifischen Sequenzen eine ebenso hohe Affinität aufweisen.

Im Unterschied zu Arg145<sub>C1</sub> und Arg145<sub>C4</sub> band das Peptid Arg145<sub>mono</sub> nicht an die Sequenzen von *EcoRI* und *EcoRV*, wohl aber an jene von *HpaII* und *Hinfl*. Die Bindungskonstante für die *HpaII*-Erkennungssequenz kam durch die Überlappung mit der Erkennungssequenz für *Hinfl* zustande, da bei der Messung der Bindungskonstante des Peptids mit dem unspezifischen Oligonukleotid keine Bindung mehr ermittelt werden konnte. Es ist möglich, daß durch die monodentate Natur des Peptids Arg145<sub>mono</sub> eine Bindung an die kürzere Erkennungssequenz von *Hinfl* mit GANTC günstiger war als für jene von *EcoRI* und *EcoRV*. Die hauptsächliche DNA-Erkennung liegt daher auf den äußeren beiden Basenpaaren.

Im Vergleich zu den Peptiden der Gruppe His147 hatte das Hinzufügen der Aminosäure Lys148 einen totalen Verlust der Bindungskapazität zur Folge. Es kann sich hierbei nicht um einen Ladungseffekt handeln, wie er bei den Messungen der immobilisierten Peptide gefunden wurde. In der Endonuklease wird von Lys148 ein Kontakt zum Phosphatrückgrat der DNA hergestellt, so daß eine Unterstützung der Bindung des Peptids durch diese Position möglich erschien. Im Unterschied zu den Verknüpfungspunkten Arg145 und His147 jedoch stehen die Aminosäuren Lys148 in der DNA-Kokristallstruktur mit 10,9Å weiter auseinander als die anderen. Es ist daher denkbar, daß durch die Verknüpfung an dieser Stelle eine Konformation, wie sie im Kristall vorliegt, nicht eingenommen werden konnte. Unter Umständen war die Salzbrücke zwischen Arg145 und Glu144 nicht länger möglich, so daß keine Ausrichtung

der Peptide erfolgte.

In Analogie zu den Experimenten von Jeltsch *et al.* (1995b) wurden die Peptide der Gruppe  $\alpha 4$  mono- und bidentat hergestellt. Ebenso wie bei der Gruppe Arg145 war eine Steigerung der Bindungskonstante durch die Verknüpfung zu verzeichnen, die größer war als es durch die doppelte Anzahl von *Extended chain*-Motiven erklärbar ist. Wie bei der Gruppe His147 war kein Unterschied in der Bindung der Peptide für die Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *EcoRV* zu verzeichnen, jedoch waren in diesem Fall die Bindungskonstanten für den Lysin-*Linker* (C4) etwas höher als für DAP (C1).

Die detektierbare Bindung des Peptids  $\alpha 4_{\text{mono}}$  im Vergleich zu Arg145<sub>mono</sub> kann zum einen durch das zusätzliche Lysin bedingt sein, das sich am Ende von  $\alpha 4_{\text{mono}}$  befindet.

Um eine Aussage über die Spezifität der Peptidbindung an DNA zu erlauben, wurden Experimente der Gruppen Arg145, His147 und  $\alpha 4$  in Gegenwart von poly-dIdC ausgeführt. Dabei wurde ein 100facher Überschuß dieser artifiziellen, völlig unspezifischen DNA über das Oligonukleotid verwendet. Es konnte zwar ein leichtes Sinken der Bindungskonstanten ermittelt werden, jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Messungen für die Gruppen Arg145 und His147, für die schon eine unterschiedliche Bindungsart durch die Messung eines spezifischen und unspezifischen Oligonukleotid ermittelt wurde. Daher ist fraglich, ob ein Überschuß von 100 an unspezifischer DNA ausreicht, um einen Unterschied zu bewirken, da die Peptidkonzentration im millimolaren Bereich noch immer deutlich größer war. Für die Gruppe  $\alpha 4$  ist daher keine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung möglich, durch die Messungen mit dem unspezifischen Oligonukleotid sollten sie nachgeholt werden. Es ist anzunehmen, daß sich in Analogie zu den Experimenten von Jeltsch *et al.* (1995b) eine gewisse Spezifität nachweisen läßt.

Die geringen Bindungskonstanten von immobilisierten Peptiden für DNA mit können durch hydrophoben Kontakte zwischen den Peptidarmen hervorgerufen worden sein, so daß keine gute Öffnung der Struktur möglich war. Ein Austausch der hydrophoben Aminosäuren Met137 bis Gly140 erschien nicht sinnvoll, da von ihnen viele Kontakte zur DNA ausgebildet werden. Ausgewählt wurde daher die Aminosäure Ile143, die in der DNA-Kokristallstruktur keinen Kontakt zur DNA herstellt (Abbildung 4.4). Der Austausch erfolgte gegen die hydrophile Aminosäure Serin.

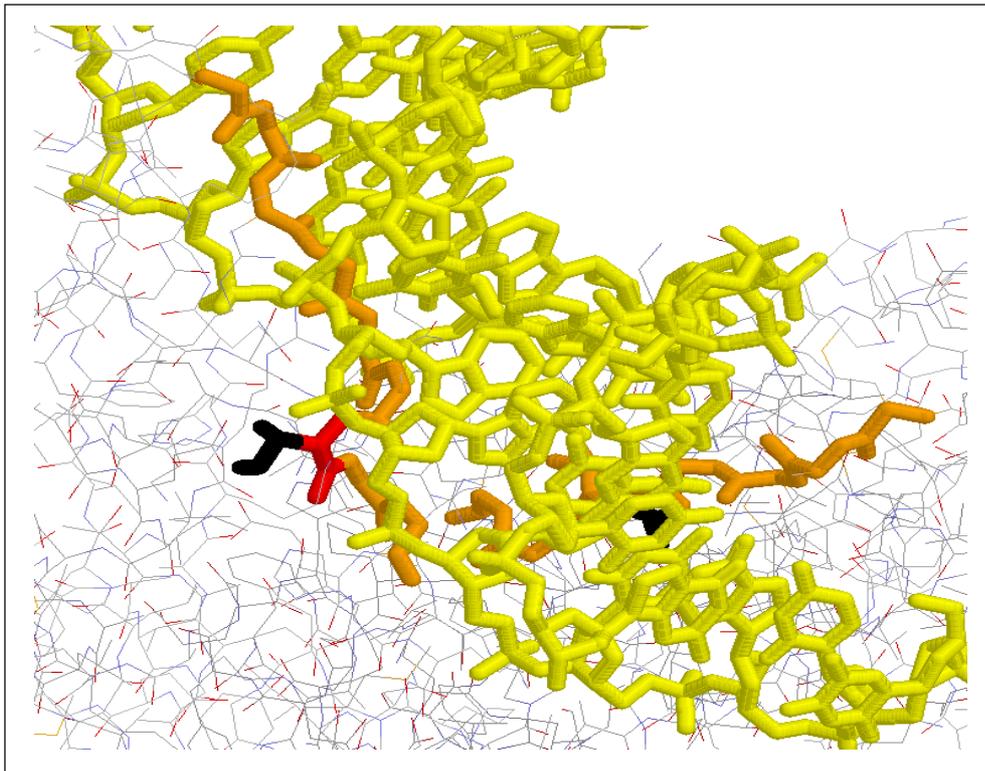


Abb. 4.4: Position der Aminosäureseitenkette von Ile143 im *EcoRI*-DNA-Kokristall; gelb: DNA, orange: Phosphatrückgrat der *Extended chain* (Met137 bis Arg145), rot: Rückgrat Ile143; schwarz: Seitenkette Ile143.

Sowohl für das mono- als auch das bidentate Peptid konnten nur eine geringe Bindungskonstante ermittelt werden, die gerade oberhalb der Detektionsgrenze lag. Trotz der Tatsache, daß Ile143 in der Kristallstruktur keine Wechselwirkung mit der DNA eingeht, war die Anwesenheit für die Bindungsfähigkeit der Peptide von großer Bedeutung. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß die Peptide nicht die Struktur einnehmen, wie sie im Kristall mit spezifischer DNA vorliegt, sondern durch die größere Flexibilität ohne den Rest des Proteinkörpers zusätzlich noch andere Kontakte zur DNA ausbilden konnten. Es war daher kein direkter Vergleich zwischen den Bindungsdaten für die Peptide und die dazugehörigen Enzymvarianten möglich. Leider liegen keine Proteine mit einer Mutation in Ile143 vor, um die Aussagen, die aus der Kokristallstruktur gezogen wurden, zu stützen.

Es ist auch denkbar, daß durch die Mutation von Isoleucin zu Serin die Möglichkeiten zur Interaktion zwischen den Peptiden gesteigert wurden, so daß ein Kontakt zur DNA noch unvorteilhafter geworden wäre. Für die bidentaten Peptide wurde in den Messungen eine Ausschlußgrenze ermittelt. Zum Beispiel für Arg145<sub>C1</sub> konnte ab einer Peptidkonzentration um 0,5mM keine Spaltung des Oligonukleotids mehr festgestellt werden. Die Kinetiken zeichnen sich in einem solchen Fall durch einen plötzlichen Abfall auf 0% Spaltung aus. Dies wurde nur bei den Peptiden mit einer gut detektierbaren Bindungskonstante (Gruppen Arg145, His147 und  $\alpha$ 4) festgestellt.

In einer analytischen Ultrazentrifugation von Arg145<sub>C1</sub> mit dem spezifischen Oligonukleotid konnte diese Vermutung bestätigt werden. Als Meßgröße diente hier die

Absorption des Oligonukleotids, das durch den Zusatz von Peptid quantitativ aus der Lösung in der Meßzelle ausgefällt wurde. Allerdings konnte hier schon bei einem 250fachen Überschuß von Peptid zu Oligonukleotid die vollständige Fällung beobachtet werden. Dabei muß allerdings beachtet werden, daß die Konzentrationen insgesamt um den Faktor 16 größer waren. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß ab einer bestimmten Peptidkonzentration die Interaktion zwischen den Peptidarmen stark genug wird, um eine Fällungsreaktion zu bewirken und das Oligonukleotid so vor der Spaltung durch die Restriktionsendonuklease zu bewahren. Durch die ähnlichen Molekulargewichte von Peptid und Oligonukleotid konnten in der Ultrazentrifugation keine aussagekräftigen Daten erhalten werden, die mit Peptidüberschuß und Messung der UV-Absorption des Oligonukleotids bei 260nm stattfand. Mit der Markierung des Peptids (zum Beispiel der N-terminalen Aminogruppe mit einem Farbstoff) wäre der Einsatz eines Oligonukleotidüberschusses möglich, so daß unter Umständen eine genauere Charakterisierung der Bindung möglich wird.

Um Peptide größerer Flexibilität zu erzeugen, wurden zwischen die Aminosäuren Arg145 und den *Linker* drei weitere Glycine eingefügt. Die Peptide der Gruppe Gly145 zeigten jedoch nur eine geringe Bindungskonstante, die durch den bidentaten Ansatz nicht verbessert wurde. Die Kontakte der Aminosäuren Arg145 bis Met137 waren offenbar nicht stark genug, um diese zusätzlichen Glycine zu tolerieren. In analoger Weise wirkte sich auch der Ersatz der Aminosäure Arg145, Glu144 und Ile143 durch Glycin aus, die Peptide der Gruppe Gly142 zeigen kaum detektierbare Bindung. Die Ergebnisse mit Peptiden der Gruppe Ser143, bei denen schon der Ersatz der Aminosäure Ile143 zu einem Verlust der Bindungsaktivität führte, korrelieren mit diesen Messungen.

Durch die Verknüpfung zum bidentaten Peptid war für die Peptide der Gruppen Arg145 und  $\alpha 4$  eine deutliche Steigerung der Bindungskonstante zu verzeichnen. In den Reaktionsansätzen befinden sich im Vergleich zum monodentaten Peptid bei gleicher Konzentration doppelt so viele bindungsfähige Peptidarme. Die Bindungskonstante der bidentaten Peptide war jedoch um ein Vielfaches höher als die Steigerung in der Anzahl der Arme, so daß es sich nicht nur um einen Konzentrationseffekt handeln kann. Bei der Bindung durch ein monodentates Peptid ist für den Schutz einer gesamten Erkennungssequenz eine Dimerisierung nötig, die erst auf der DNA stattfinden kann. Es handelt sich dabei also um zwei getrennte Bindungsereignisse. Durch die Verknüpfung der Arme wird die Bindung zu einem Einzelereignis, denn bereits durch die Bindung eines Armes befindet sich der andere in prädestinierter Position für die Bindung der zweiten Halbseite der Erkennungssequenz.

Es ist denkbar, daß der Schutz einer Sequenz durch die Arme getrennter bidentater Peptide erfolgte. Es kann sich dabei allerdings nicht um den Regelfall handeln, da so der drastische Anstieg in der Bindungskonstante vom mono- zum bidentaten Pep-

tid nicht erklärlich ist. Ein Öffnen der Peptidarme zum Umfassen der DNA ist Voraussetzung, um diese Steigerung zu erreichen.

Die Rolle der *Linkermoleküle* dagegen ist offenbar auf die reine Zusammenführung von Peptidarmen beschränkt. Die unterschiedliche Anzahl von CH<sub>2</sub>-Gruppen in den *Linkern* Diaminopropionsäure (DAP, C1) und Lysin (C4) hat nur einen geringen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit oder die Spezifität der Peptide. Möglich ist, daß die vier CH<sub>2</sub>-Gruppen des Lysins eine genügend große Flexibilität aufwiesen, um den Kontakt von Peptidarm und DNA nicht zu stören. Dafür spricht auch, daß mit den immobilisierten Peptiden keine Unterschiede zwischen den *Linkern* gefunden wurden.

Im Vergleich der Gruppen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen: Die Verknüpfung der *Extended chain* an der Position Arg145 führt zu Peptiden, die mit einer Bindungskonstante um 10<sup>4</sup> in der Lage sind, DNA zu binden. Dabei weisen sie eine etwas höhere Spezifität für die kognate Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRI* auf, jedoch ist auf diesem Oligonukleotid auch eine Bindung der Sequenzen von *EcoRV* (GATATC) und *Hinfl* (GANTC) möglich, so daß insgesamt von einer Erkennung von Sequenzen mit GAN(N)TC ausgegangen werden muß. Sie wird in jedem Fall von der Erkennungssequenz von *HpaII* (CCGG) unterschieden, die nicht in gleichem Maße gebunden wird.

Es wurde gezeigt, daß die strukturellen Eigenschaften der Verknüpfung an Arg145 ausreichend sind, um diese Bindung zu fördern, daß jedoch jegliche Veränderung dieses Systems zu einer Verschlechterung der Bindungskonstante führt. Dies bezieht sich zum einen auf eine Erweiterung der Aminosäuresequenz durch Verknüpfung erst bei His147, die nicht zu einer Einschränkung der DNA-Bindungsfähigkeit führen, jedoch zu einem Verlust der Spezifität. Eine Einführung von Glycinen zwischen der Aminosäure 145 und dem *Linker* führt sogar zu einem kompletten Verlust der Bindungskapazität. Zum Anderen ist die Sequenz anfällig für Aminosäureaustausche, selbst wenn diese Seitenketten in der DNA-Kokristallstruktur bedeutungslos erscheinen (Ile143).

Die Experimente von Jeltsch *et al.* (1995b) stehen nicht im Widerspruch mit den hier ermittelten Daten. Gemessen wurde dort nur mit einem einzigen monodentaten Peptid, für das die Hemmung einer Oligonukleotidsplaltung im Faktor 1,4 angegeben wurde. Die in dieser Arbeit ermittelte Bindungskonstante von 4·10<sup>2</sup>M<sup>-1</sup> steht damit in Einklang.

Durch die Hemmung der Spaltung von Plasmid-DNA ist von Jeltsch *et al.* eine Bindungskonstante von 3·10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup> abgeschätzt worden, die spezifisch für die kognate Sequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRI* gilt. Hier muß jedoch bedacht werden, daß die Ermittlung der Bindungskonstante in diesem Fall durch eine Vielzahl verknüpfter Gleichgewichte errechnet wurde, die über einen längeren Zeitraum betrachtet

wurden. Zudem sind die Messungen auf Plasmid-DNA, die auch mit den bidentaten Peptiden durchgeführt wurden, als weniger verlässlich anzusehen, da die Spezifität des Peptids nicht allein durch die Erkennungssequenz, sondern auch durch die anderen Sequenzen dieser DNA beeinflusst wird. Durch die Verwendung von *Single turn over*-Bedingungen und die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten sind die hier ermittelten Bindungskonstanten noch immer aus indirekter Messung berechnet, aber sie sind als weniger fehlerbehaftet anzusehen. Durch die eingestellten Bedingungen kann jedes zugängliche Oligonukleotid sofort gespalten werden, während die Spaltung der Plasmid-DNA längere Zeit in Anspruch nimmt. Die Reaktionsbedingungen sind insgesamt von einer Vielzahl von Randbedingungen abhängig, die durch die Verwendung von *Single turn over*-Bedingungen minimiert wurden.

Von Jeltsch *et al.* konnte eine Spezifität des Peptids  $\alpha 4$  nachgewiesen werden. Da der hier verwendete Zusatz von poly-dIdC keine Unterscheidungsmöglichkeit von spezifischer und unspezifischer Bindung erbrachte, ist keine abschließende Aussage über die Spezifität der Peptide der Gruppe  $\alpha 4$  möglich. Im Vergleich der Messungen ist aber zu bedenken, daß das hier verwendete Peptid  $\alpha 4_{\text{mono}}$  zusätzlich ein Lysin trägt, das für ein verändertes Verhalten verantwortlich sein kann.

Insgesamt zeichnen die ermittelten Daten durch den experimentellen Ansatz und die Diversität der Messungen ein detaillierteres Bild der DNA-Bindungseigenschaften der *Extended chain*-Peptide, als es durch die Untersuchungen eines Peptids möglich ist.

## 4.4 Abschließende Betrachtungen zur Bedeutung der Dimerisierung für *EcoRI*

Die Experimente auf vielen verschiedenen Ebenen haben gezeigt, daß Dimerisierung für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* unerlässlich ist und nur durch die Kooperation beider Untereinheiten die hohe Präzision des Enzyms entwickelt werden kann. Durch das beidseitige Umschließen der DNA kann der spezifische Komplex mit GAATTC erreicht werden, in dem zahlreiche Kontakte geknüpft werden. Konformationelle Änderungen in den Strukturen von DNA und Protein führen vor allem zur Entwindung der großen Grube, so daß die Einlagerung der beiden Erkennungshelices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  ermöglicht wird.

Eine bindende monomere Untereinheit kann die Aufwindung der DNA nicht erreichen. Zwar sind hier zumindest die Hälfte der Kontakte möglich, aber ohne das Gegenhalten der anderen Untereinheit können Bindungen zur Basensequenz nicht ausgebildet werden, die für die konformationelle Änderung der DNA benötigt werden. So weist DNA-Erkennung keine Sequenzspezifität mehr auf, sondern ist nur noch von

anderen Charakteristika der DNA, wie zum Beispiel ihrer Flexibilität, abhängig.

Analoge Ergebnisse wurden aus dem Vergleich der Bindungsfähigkeit von Peptiden gewonnen, deren Sequenz der *Extended chain* entspricht: Monodentate Peptide weisen eine viel geringere Bindungskonstante auf als die entsprechenden bidentaten Varianten. Durch die artifizielle Verbindung der Peptidarme wird der Dimerisierungsprozeß, der bei einem monodentaten Peptid erst auf der DNA stattfinden kann, umgangen, so daß sich eine Steigerung der Bindungskapazität ergibt.

Ein bidentates Peptid der *Extended chain* kann ohne den Rückhalt einer größeren Proteinstruktur eine Entwindung der großen Grube nicht erreichen, so daß eine analoge Erkennung wie im vollständigen Enzym nicht zu erwarten ist. Es muß jedoch nur ein Peptidstrang in die große Grube eingebracht werden, so daß eine vollständige DNA-Entwindung in einer dem Enzym entsprechenden Weise unter Umständen nicht nötig ist. In jedem Fall ist eine Bindung an die äußeren Basenpaare möglich, so daß sich eine Spezifität für Sequenzen mit GAN(N)TC ergibt.

Allein die Anwesenheit beider Untereinheiten ist jedoch für die Funktion der Restriktionsendonuklease nicht ausreichend, sie müssen auch in einem umfangreichen Netzwerk von Bindungen aufeinander abgestimmt sein. Die Kopplung von Erkennung und Katalyse ist offenbar weitreichender als bisher angenommen, denn es besteht eine gegenseitige Beeinflussung dieser Prozesse in beiden Richtungen, die das dimerere Enzym als eine enzymatische Einheit erscheinen läßt, in der die Untereinheiten nicht unabhängig voneinander agieren können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNGEN

### 5.1 Zusammenfassung

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* ist als homodimeres Enzym auf das optimale Zusammenspiel ihrer Untereinheiten angewiesen. Sie bilden gemeinsam die DNA-Bindungsstelle und kooperieren in der Erkennung der kognaten Sequenz GAATTC. Durch die Kontakte zwischen Enzym und DNA wird eine Aufwindung der großen Grube erreicht, die eine Einlagerung der beiden Erkennungshelices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  sowie der *Extended chain* erlaubt.

Kommt es zu einer Störung in der hydrophoben Kontaktfläche der Untereinheiten, so ist nach einer Dissoziation des Dimers in monomere Untereinheiten eine effiziente DNA-Bindung nicht mehr möglich. Durch das daraus folgende Unvermögen, die DNA aufzuwinden, ist die Einlagerung der Erkennungselemente des Enzyms behindert, und es resultiert ein Protein, das in seiner Erkennung nicht mehr durch die Basensequenz, sondern durch andere Eigenschaften der DNA wie zum Beispiel ihre Flexibilität gelenkt wird. Eine gezielte Destabilisierung der Interaktionsfläche ist durch die Einführung der geladenen Aminosäure Aspartat an der Position von Leu158 möglich, wobei im Vergleich zu den Mutanten L158N und L158H ermittelt werden konnte, daß sowohl die negative Ladung wie die Größe des Aspartats für die resultierende Destabilisierung verantwortlich sind.

Die Symmetrie der Erkennungssequenz GAATTC spiegelt sich im *EcoRI*-Dimer wider, deren *Extended chain*-Motive einander an den Positionen Arg145 bis Lys148 nahe kommen. Die Erkennung wird in großem Maße von der *Extended chain* bestimmt, wobei das DNA-Bindungsvermögen eines isolierten Peptids dieser Sequenz an GAATTC nachgewiesen werden konnte [Jeltsch *et al.*, 1995b]. Die Verknüpfung des Peptids zu einer bidentaten Struktur, ähnlich jener Konfiguration wie sie im Enzym vorliegt, führt zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Bindungskonstante. Eine meßbare Sequenzspezifität kann dabei lediglich für Peptide erzielt werden, die durch einen *Linker* an der Aminosäureposition Arg145 verbunden sind. Sie beschränkt sich jedoch nicht auf die kognate Sequenz GAATTC, sondern es werden auch GATATC (*EcoRV*-Erkennungssequenz) und GANTC (*Hinfl*-Erkennungssequenz) mit vergleichbarer Affinität gebunden, so daß sich eine Konsensussequenz von GAN(N)TC ergibt. Eine dem Restriktionsenzym entsprechende Spezifität ist schon deshalb unwahrscheinlich, da dem Peptid neben der zweiten Erkennungshelix auch die Möglichkeit fehlt, die DNA in analoger Weise zum Enzym aufzudrehen und die inneren Basenpaare zu kontaktieren.

Mutagenese innerhalb des *ecoRI*-Gens führt im homodimeren Enzym zu der Einführung der Mutation in beide Untereinheiten. Daher sind Untersuchungen zur Kopp-

lung beider Untereinheiten nur durch eine Charakterisierung von Heterodimeren möglich, die *in vitro* durch das Mischen entsprechender Mutanten hergestellt werden können. Dabei ergeben sich Schwierigkeiten sowohl in der Austauschrate der Untereinheiten zur Bildung der Heterodimere wie in ihrer Stabilisierung. Eine kovalente Verknüpfung der Zielmoleküle kann durch eine *Cross link*-Reaktion erfolgen, mit der die Dissoziation einmal gebildeter Heterodimere verhindert werden kann. Leider konnte jedoch im Zusammenwirken mit den oben beschriebenen destabilisierenden Mutationen in der Interaktionsfläche keine ausreichende Menge Heterodimer für eine Charakterisierung erhalten werden.

*EcoRI* besitzt eine natürliche Aggregationsneigung, die sich in höher konzentrierten Lösungen durch das Auftreten von Tetrameren äußert. Durch die Fusion mit dem Hexahistidintag wurde diese Eigenschaft verstärkt, so daß Proteinuntersuchungen in höherer Konzentration durch die entstehenden Aggregate von sieben bis acht Untereinheiten erschwert oder sogar verhindert werden. Mit der Fusion der *EcoRI* an den *StrepTag II* scheint diese Problematik behoben.

Gleichzeitig bietet ein zweiter Affinitätstag die Möglichkeit, heterodimere Enzyme *in vivo* herzustellen. Nach Koexpression beider Untereinheiten innerhalb einer Zelle ist die Aufreinigung des gewünschten Heterodimers durch die beiden Affinitätstags durchführbar. Die Stabilität eines solchen Heterodimers ist in keiner Weise beeinträchtigt und erlaubt die Bildung eines stabilen Proteins. Auf diese Weise wurde ein Protein aus einer wt-Untereinheit und einer katalytisch inaktiven Mutante (D91A) hergestellt. So konnte nachgewiesen werden, daß sich die Kooperation der Untereinheiten nicht darauf beschränkt, die Katalyse als Folge der spezifischen Bindung auszulösen, sondern es existiert auch eine Rückkopplung dieser Prozesse, da die katalytische Inaktivität nur einer Untereinheit zu einer fast vollständigen Inaktivierung des gesamten Enzyms führt. Diese Untersuchungen stehen noch am Anfang, doch scheint es durch die hier vorgestellten Ergebnisse gesichert, daß *EcoRI* nur als dimerer Einheit ihre Funktion, die sequenzspezifische Restriktion, ausführen kann.

**Schlagworte:** *EcoRI*, Monomer-Dimer-Wechselwirkungen, heterodimere Enzyme

## 5.2 Abstract

As a homodimeric enzyme the restriction endonuclease *EcoRI* depends on the cooperation of its two subunits. Together they form the DNA binding site and recognize the canonical sequence GAATTC. Specific contact of both subunits allows a widening of the major groove followed by the exact placement of the recognition helices  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  and the extended chain motif into the major groove.

Disturbances of the hydrophobic interface can lead to the dissociation of the homodimer. Destabilization of the hydrophobic interface has been achieved by mutating leu158 as part of the intersubunit contact to aspartate. A comparison to L158N and L158H shows that the destabilization is due to the negative charge of aspartate as well as its size. The resulting monomeric subunits are no longer able to bind DNA efficiently and therefore cannot widen the major groove to position the recognition elements correctly. Other characteristics of DNA, e.g. its flexibility, become more important for such a mutant than the DNA sequence.

The symmetry of the canonical sequence is mirrored by the dimeric enzyme and its main recognition elements, the extended chain motifs, that come close to each other at positions arg145 and lys148. A peptide comprising the amino acid residues of the extended chain has been shown to bind to the canonical sequence [Jeltsch *et al.*, 1995b]. Bidentate peptides that imitate the structure of the enzyme show increased binding capabilities. Sequence specificity could only be detected for peptides linked at the position arg145 but recognition is not restricted to the canonical *EcoRI* site (GAATTC) as binding of the *EcoRV* recognition sequence (GATATC) and *HinI* recognition sequence (GANTC) is detectable with a similar binding constant. Recognition equal to the protein is unlikely because not only the inner recognition helix is absent in the peptide but a widening of the major groove to contact the inner base pairs is not possible without the armlike structures of the enzyme.

Mutagenesis of the *ecoRI*-gene leads to an enzyme with identically mutated subunits. Therefore the study of cooperation and communication between the two subunits is only possible by characterizing heterodimeric enzymes. Mixing of mutants *in vitro* leads only to a slow rate of exchange between the mutants and the resulting heterodimers are not stabilized. With a cross link reaction the heterodimers can be connected covalently to prevent dissociation of built heterodimers. In combination with the destabilized mutants described above a higher exchange rate between subunits could be achieved. The amount of heterodimeric enzyme detected was not sufficient for a characterization.

*EcoRI* has a natural tendency to appear as a tetrameric enzyme in high concentrations. Fusion with the hexahistidine tag increased this property leading to reversible protein aggregates of seven to eight subunits. Experiments are more

difficult or even hindered by these protein complexes. Fusion of the *ecoRI*-gene to the *StrepTag II* seems to have eliminated these problems.

With the use of two affinity tags heterodimeric enzymes can be expressed *in vivo* and their isolation is possible. Stability of such a protein is not compromised. The heterodimeric protein isolated first consists of a wildtype subunit and a subunit of a catalytically inactive mutant (D91A). The results suggest that the cooperation between the subunits is not one-directional (catalysis as a consequence of specific binding) but two-directional as the inability to cleave in one subunit leads to an almost catalytically inactive dimeric protein. The work is still in the beginning but it seems that *EcoRI* acts as a dimeric unit that is able to function only with two intact subunits.

**keywords:** *EcoRI*, monomer-dimer equilibrium, heterodimeric enzyme

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alves, J., Pingoud, A., Langowski, J., Urbanke, C. & Maass, G. (1982)  
Two identical subunits of the *EcoRI* restriction endonuclease co-operate in the binding and cleavage of the palindromic substrate  
*Eur. J. Biochem.* **124**: 139
- Alves, J., Pingoud, A., Haupt, W., Langowski, J., Peters, F., Maass, G. & Wolff, C. (1984)  
The influence of sequences adjacent to the recognition site on the cleavage of oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* endonuclease  
*Eur. J. Biochem.* **140**: 83
- Alves, J., Rüter, T., Geiger, R., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989a)  
Changing the hydrogen-bonding potential in the DNA binding site of *EcoRI* by site-directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, the preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site -GAATTC-  
*Biochemistry* **28**: 2678
- Alves, J., Urbanke, C., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1989b)  
Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* restriction endonuclease  
*Biochemistry* **28**: 7879
- Anderson, J.E. (1993)  
Restriction endonucleases and modification methylases  
*Curr. Op. Struct. Biol.* **3**: 24
- Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsfaki, D., Tucker, P.A. Wilson, K.S. & Kokkinidis, M. (1994)  
Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*  
*Nat. Struct. Biol.* **1**: 469
- Bickle, T.A. (1993)  
The ATP-dependent restriction enzymes  
in *Nucleases* (Linn, S.M., Lloyd, R.S., Roberts, R.J., Eds): 89, Cold Spring Harbor, New York
- Bozic, D., Grazulis, S., Siksnys, V. & Huber, R. (1996)  
Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr10I* at 2.15Å resolution  
*J. Mol. Biol.* **255**: 176

- Bradshaw, T.P. & Dunlap, R.B. (1993)  
Characterization of a novel form of thymidylate synthase: a heterodimer isolated after specific chemical modification of the immobilized native enzyme  
*Biochemistry* **32**: 12774
- Brukner, I., Sánchez, R., Suck, D. & Pongor, S. (1995)  
Sequence-dependent bending propensity of DNA Aminosäure revealed by DNase I: parameters for trinucleotides  
*EMBO J.* **14**: 1812
- Chen, Y.H., Yang, J.T. & Martinez, H.M. (1972)  
Determination of secondary structure of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion  
*Biochemistry* **22**: 4120
- Cheng, X. (1995a)  
Structure and function of DNA methyltransferases  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 293
- Cheng, X. (1995b)  
DNA modification by methyltransferases  
*Curr. Op. Struct. Biol.* **5**: 4
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Jucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. & Xu, M.-Q. (1997)  
Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element  
*Gene* **192** (2): 271
- Connolly, B.A., Eckstein, F. & Pingoud, A. (1984)  
The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI* catalyzed reaction  
*J. Biol. Chem.* **259** (17): 10760
- Distefano, M.D., Moore, M.J. & Walsh, C.T. (1990)  
Active site of mercury reductase resides at the subunit interface and requires Cys135 and Cys140 from one subunit and Cys558 and Cys559 from the adjacent subunit: evidence from *in vivo* and *in vitro* heterodimer formation  
*Biochemistry* **29**: 1498
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988)  
High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation  
*Nucl. Acids Res.* **16**: 6127
- Ehbrecht, H.-J., Pingoud, A., Urbanke, C., Maass, G. & Gualerzi, C. (1985)  
Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA  
*J. Biol. Chem.* **260** (1): 6160

- Engel, C. (1993)  
Proteindesign zur Erweiterung der Substratspezifität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Engler, L.E., Welch, K.K. & Jen-Jacobson, L. (1997)  
Specific binding by *EcoRV* endonuclease to its DNA recognition site GATATC  
*J. Mol. Biol.* **269**: 82
- Flaman, J.M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S.H. & Iggo, R. (1994)  
A rapid PCR fidelity assay  
*Nucleic Acids Res.* **22**: 3259
- Flores, H., Osuna, J., Heitman, J. & Soberón, X. (1995)  
Saturation mutagenesis of His<sup>114</sup> of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants  
*Gene* **157**: 295
- Fritz, A. (1991)  
Herstellung und Charakterisierung der Mutanten N141S, A, D, Y der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Messing, J. & Shepherd, R.J. (1982)  
Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *EcoRI*<sup>\*</sup>  
*DNA* **1** (2): 109
- Geiger, R., Rüter, T., Alves, J., Fliess, A., Wolfes, H., Pingoud, V., Urbanke, C., Maass, G., Pingoud, A., Düsterhöft A. & Kröger, M. (1989)  
Genetic engineering of *EcoRI* mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site. Physico-chemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln144Lys145 and Gln144Lys200 mutants  
*Biochemistry* **28**: 2667
- Geiger, R. (1990)  
Konstruktion, Isolierung und Charakterisierung von *EcoRI*-Mutanten mit Aminosäuresubstitution in der DNA-Bindungsstelle  
Dissertation, Universität Hannover
- Ghosh, S.S., Obermiller, P.S., Kwok, T.J. & Gingeras, T.R. (1990)  
Analysis of substrate specificity of the *PaeR7* endonuclease: effect of base methylation on the kinetics of cleavage  
*Nucleic Acids Res.* **18**: 5063

- Goodman, H.M., Greene, P.J., Garfinf, D.E. & Boyer, H.W. (1977)  
DNA site recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease and modification methylase  
in *Nucleic acid - protein recognition* (Vogel, E.J., Ed.): 239, Academic Press, New York
- 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. & Alves, J. (1995)  
Site-directed mutagenesis in the catalytic center of the restriction endonuclease *EcoRI*  
*Gene* **157**: 113
- Grabowski, G. (1998)  
Untersuchungen zum Mechanismus der Katalyse und zu *In vivo*-Selektionssystemen für die Anreicherung von Mutanten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* mit veränderter DNA-Bindungs- oder Spaltspezifität  
Dissertation, Universität Hannover
- Greene, P., Gupa, M. & Boyer, H. W. (1981)  
Sequence analysis of the DNA encoding the *EcoRI* endonuclease and methylase  
*J. Biol. Chem.* **256**: 2143
- Greene, P.J., Maley, F., Pedersen Lane, J. & Santi, D.V. (1993)  
Catalytically active cross-species heterodimers of thymidylate synthase  
*Biochemistry* **32**: 10283
- Hanahan, D. (1983)  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
*J. Mol. Biol.* **166**: 557
- Hedgpeth, J., Goodman, H. M., & Boyer, H. W. (1972)  
DNA Nucleotide Sequence Restricted by the RI Endonuclease.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**: 3448
- Heitman, J. (1993)  
On the origins, structures and functions of restriction-modification enzymes  
in *Genetic engineering* (Setlow, J.K., Ed.): 57, Plenum Press, New York
- Hochuli, E. (1990)  
Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbents  
in *Genetic Engineering, Principles and Methods* (Setlow, J.K., Ed.) **12**: 87, Plenum Press, New York

Hsu, M. & Berg, P. (1978)

Altering the specificity of restriction endonucleases: effect of replacing  $Mg^{2+}$  with  $Mn^{2+}$   
*Biochemistry* **17**: 131

Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimasauskas, S. & Butkus, V. (1992a)

Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase-  
prototypes of a new class (type IV)  
*Nucleic Acids Res.* **20**: 6043

Janulaitis, A., Vaisvila, R., Timinskas, A., Klimasauskas, S. & Butkus, V. (1992b)

Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-  
modification enzymes  
*Nucleic Acids Res.* **20**: 6051

Jeltsch, A., Alves, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1992)

On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*  
*FEBS Lett.* **304**: 4

Jeltsch, A., Alves, J., Oelschläger, T., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993a)

Mutational analysis of the function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a  
critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -  
GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis  
*J. Biol. Chem.* **229**: 221

Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1993b)

Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV*  
restriction enzymes  
*Biochemistry* **90**: 8499

Jeltsch, A. (1994)

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Untersuchungen zur Evolution, linearen  
Diffusion, DNA-Erkennung und zum Mechanismus der DNA-Spaltung  
Dissertation, Universität Hannover

Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. & Pingoud, A. (1994)

Pausing of the restriction endonuclease *EcoRI* during linear diffusion on DNA  
*Biochemistry* **33**: 10215

Jeltsch, A., Pleckaityte, M., Selent, U., Wolfes, H., Siknys, V. & Pingoud, A. (1995a)

Evidence for substrate-assisted catalysis in the DNA cleavage of several restriction  
endonucleases  
*Gene* **157**: 157

Jeltsch, A., Alves, J., Urbanke, C., Maass, G., Eckstein, H., Lianshan, Z., Bayer, E. & Pingoud, A. (1995b)

A dodecapeptide comprising the extended chain- $\alpha$ 4 region of the restriction endonuclease *EcoRI* specifically binds to the *EcoRI* recognition site  
*J. Biol. Chem.* **270**: 5122

Jeltsch, A., Wenz, C., Stahl, F. & Pingoud, A. (1996)

Linear diffusion of the restriction endonuclease *EcoRV* on DNA is essential for the *in vivo* function of the enzyme  
*EMBO J.* **15**: 5104

Jen-Jacobson, L., Engler, L.E., Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R., Yee, C. & McVerry, B. (1996)

Structural adaptations in the interaction of *EcoRI* endonuclease with methylated GAATTC sites  
*EMBO J.* **15**: 2870

Johannssen, W., Schütte, H., Mayer, H. & Mayer, M. (1984)

Structural analysis of *EcoRI*-DNA complexes as revealed by electron microscopy  
*Arch. Microbiol.* **140**: 265

Johnson, W.J. (1988)

Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy  
*Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**: 145

Johnson, W.J. (1990)

Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide  
*Proteins* **7**: 205

Jost, J.P. & Saluz, H.P. (1993)

*DNA methylation: molecular biology and biological significance*  
Birkhäuser Verlag, Basel

Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J. & Rosenberg, J.M. (1990)

Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing  
*Science* **249**: 13307

Kindler, B. (1997)

Akkuprog: Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge. Anwendung auf Protein-DNA Wechselwirkungen  
Dissertation, Universität Hannover

King, K., Benkovic, S.J. & Modrich, P. (1989)

Glu-111 is required for activation of the DNA cleavage of *EcoRI* endonuclease  
*J. Biol. Chem.* **264** (20): 11807

- Kostrewa, D. & Winkler, F.K. (1995)  
Mg<sup>2+</sup> binding to the active site of *EcoRV* endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2Å resolution  
*Biochemistry* **34**: 683
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B. & Fritz, H.J. (1984)  
The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction  
*Nucleic Acids Res.* **12**: 9441
- Krüger, D.H., Kupper, D., Meisel, A., Reuter, M. & Schroeder, C. (1995)  
The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral genomes  
*FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 177
- Küster, W., 1998  
Bedeutung hydrophober Kontakte für die sequenzspezifische DNA-Erkennung der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Dissertation, Universität Hannover
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* **227**: 680
- Lagunavicius, A. & Sisknys, V. (1997)  
Site-directed mutagenesis of putative active site residues of *MunI* restriction endonuclease: replacement of catalytically essential carboxylate residues triggers DNA binding specificity  
*Biochemistry* **36** (37): 11086
- Lane, A.N., Jenkins, T.C., Brown, T. & Neidle, S. (1991)  
Interaction of berenil with the *EcoRI* dodecamer d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> in solution studied by NMR  
*Biochemistry* **30**: 1372
- Langowski, J., Pingoud, A., Goppelt, M. & Maass, G. (1980)  
Inhibition of *EcoRI* action by polynucleotides. A characterization of the nonspecific binding of the enzyme to DNA  
*Nucleic Acids Res.* **8**: 4727
- Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R. & Jen-Jacobson, L. (1990)  
The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction  
*Science* **250**: 776
- Luria, S.E. & Human, M.L. (1953)  
A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses  
*J. Bacteriol.* **64**: 557

- McClarín, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J. & Rosenberg, J.M. (1986)  
Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3Å resolution  
*Science* **234**: 1526
- McClelland, M., Nelson, M. & Raschke, E. (1994)  
Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases  
*Nucleic Acids Res.* **22**: 3640
- Meisel, A., Mackeldanz, P., Bickle, T.A., Krüger, D.H. & Schroeder, C. (1995)  
Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis  
*EMBO J.* **14** (12): 2958
- Modrich, P. & Zabel, D. (1976)  
*EcoRI* endonuclease physical and catalytic properties of the homogenous enzyme  
*J. Biol. Chem.* **256**: 5866
- Kühn, C. (1995)  
Kinetische Untersuchungen zur Staraktivität der Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Mullis, K.B. & Falcon, F.A. (1987)  
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction  
*Meth. Enzym.* **155**: 335
- Needels, M.C., Fried, S.R., Love, R., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1989)  
Determinants of *EcoRI* endonuclease sequence discrimination  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3579
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L. F., Schildkraut, I., & Aggarwal, A. K. (1994)  
Structure of restriction endonuclease *BamHI* and its relationship to *EcoRI*  
*Nature* **368**: 660
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1994)  
Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding  
*Science* **269**: 656
- Oelgeschläger, T. (1992)  
Protein-Engineering an der Restriktionsendonuklease *EcoRI*: Konstruktion von Enzymvarianten mit erweiterter Substratspezifität  
Dissertation, Universität Hannover

- Osuna, J., Flores, H. & Soberón, X. (1991)  
Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities  
*Gene* **106**: 7
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (1997)  
Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases  
*FEBS Lett.* **246**: 1
- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1975)  
Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3310
- Roberts, R.J. & Macelis, D. (1999)  
REBASE - restriction enzymes and methylases  
*Nucleic Acids Res.* **27** (1): 312
- Rosati, O. (1999)  
Untersuchung und Design von DNA-Kontakten der Restriktionsendonuklease *EcoRI* inner- und außerhalb der Erkennungssequenz  
Dissertation, Universität Hannover
- Rosenberg, J.M. & Greene, P. (1982)  
*EcoRI*<sup>\*</sup> specificity and hydrogen bonding  
*DNA* **1** (2): 117
- Rosenberg, J.M. (1991)  
Structure and function of restriction endonucleases  
*Curr. Op. Struct. Biol.* **1**: 104
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I. & Banzhak, L.J. (1975)  
Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases  
in *The Enzymes* (Boyer, P., Ed.): 61
- Rotzal, L.-U. (1992)  
Molekulare Konstruktion, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung des *EcoRI*<sub>His6</sub> Fusionsproteins  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Sali, D., Bycroft, M & Fersht, A.R. (1991)  
Surface electrostatic interactions contribute little of stability of barnase  
*J. Mol. Biol.* **222**: 779
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)  
*Molecular cloning. A laboratory manual* (2. Auflage)  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991)  
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form  
*Anal. Biochem.* **199**: 223
- Schägger, H., Cramer, W.A. & von Jagow, G. (1994)  
Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis  
*Anal. Biochem.* **217**: 220
- Schmidt, T.G.M, Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996)  
Molecular interaction between the strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin  
*J. Mol. Biol.* **255**: 753
- Schulze, C., Jeltsch, A., Franke, I., Urbanke, C. & Pingoud, A. (1998)  
Crosslinking the *EcoRV* restriction endonuclease across the DNA-binding site reveals transient intermediates and conformational changes of the enzyme during DNA binding and catalytic turnover  
*EMBO J.* **17**: 6757
- Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F. & Pingoud, A. (1992)  
A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *EcoRV*  
*Biochemistry* **31**: 4808
- Siksnys, V. & Plekaityte, M. (1993)  
Catalytic and binding properties of restriction endonuclease *Cfr9I*  
*Eur. J. Biochem.* **217**: 411
- Siksnys, V., Timinskas, A., Klimasauskas, S., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1995)  
Sequence similarity among type-II restriction endonucleases, related by their recognized 6-bp target and tetranucleotide-overhang cleavage  
*Gene* **157**: 311
- Stahl, F., Wende, W., Jeltsch, A. & Pingoud, A. (1996)  
Introduction of asymmetry in the naturally symmetric restriction endonuclease *EcoRV* to investigate intersubunit communication in the homodimeric protein  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6175

- Sturrock, S.S. & Dryden, D.T.F. (1997)  
A prediction of the amino acids involved in DNA recognition by type I DNA restriction and modification enzymes  
*Nucleic Acids Res.* **25** (17): 3408
- Szybalski, W., Kim, S.C., Hasan, N. & Podhajski, A.J. (1991)  
ClassII restriction enzymes - a review  
*Gene* **100**: 13
- Taylor, J.D. & Halford, S.E. (1989)  
Discrimination between DNA sequences by the *EcoRV* restriction endonuclease  
*Biochemistry* **28**: 6198
- Taylor, J.D., Goodall, A.J., Vermote, C.L. & Halford, S.E. (1990)  
Fidelity of DNA recognition by the *EcoRV* restriction/modification system *in vivo*  
*Biochemistry* **30**: 8743
- Terry, B.J., Jack, W.E. & Modrich, P. (1985)  
Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease: nonspecific interactions in *EcoRI* catalysis  
*J. Biol. Chem.* **260**: 13130
- Thielking, V., Alves, J., Fliess, A., Maass, G. & Pingoud, A. (1990)  
The accuracy of the *EcoRI* restriction endonuclease: binding and cleavage studies with oligonucleotide substrates containing degenerate recognition sequences  
*Biochemistry* **29**: 4681
- Van Cleve, M.D. & Gumpert, R.I. (1992)  
Influence of enzyme-substrate contacts located outside the *EcoRI* recognition site on cleavage of duplex oligodeoxynucleotide substrates by *EcoRI* endonuclease  
*Biochemistry* **31**: 334
- Vennekohl, P. (1996)  
Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Stabilisierung der dimeren Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Diplomarbeit, Universität Hannover
- Vipond, I.B. & Halford, S.E. (1995)  
Specific DNA recognition by *EcoRV* restriction endonuclease induced by calcium ions  
*Biochemistry* **34**: 1113
- Vipond, I.B., Baldwin, G.S. & Halford, S.E. (1995)  
Divalent metal ions at the active sites of the *EcoRV* and *EcoRI* restriction endonucleases  
*Biochemistry* **34**: 697

- Voss, S. & Skerra, A. (1997)  
Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to a higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification  
*Protein Eng.* **10**: 975
- Ward, W.H., Jones, D.H. & Fersht, A.R. (1986)  
Protein engineering of homodimeric tyrosyl-tRNA synthetase to produce active heterodimers  
*J. Biol. Chem.* **261**: 9576
- Wende, W., Stahl, F. & Pingoud, A. (1996)  
The production and characterization of artificial heterodimers of the restriction endonuclease *EcoRV*  
*Biol. Chem.* **377**: 625
- Wilson, G.G. & Murray, N.E. (1991)  
Restriction and modification systems  
*Annu. Rev. Genet.* **25**: 585
- Windolph, S., Fritz, A., Oelgeschläger, T., Wolfes, H. & Alves, J. (1997a)  
Sequence context influencing cleavage activity of the K130E mutant of the restriction endonuclease *EcoRI* identified by a site selection assay  
*Biochemistry* **36** (31): 9478
- Windolph, S. & Alves, J. (1997)  
Influence of divalent cations on inner-arm mutants of restriction endonuclease *EcoRI*  
*Eur. J. Biochem.* **244**: 134
- Winkler, F.K., Banner, D.W., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R.S., Heathman, S.P., Bryan, R.K., Martin, P.D., Petratos, K. & Wilson, K.S. (1993)  
The crystal structure of *EcoRV* endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments  
*EMBO J.* **12**: 1781
- Wolfes, H., Alves, J., Fliess, A., Geiger, R. & Pingoud, A. (1986)  
Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 und Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *EcoRI*  
*Nucl. Acid Res.* **14**: 9063
- Wright, D.J., King, K. & Modrich, P. (1989)  
The negative charge of Glu-111 is required to activate the cleavage center of *EcoRI* endonuclease  
*J. Biol. Chem.* **264**: 11816

Yanofsky, S.D., Love, R., McClarin, J.A., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. & Greene, P.J. (1987)

Clustering of null mutations in the *EcoRI* endonuclease

*Proteins* **2**: 273

Zebala, J., Choi, J. & Barany, F. (1992)

Characterization of steady state, single turnover, and binding kinetics of the *TaqI* restriction endonuclease

*J. Biol. Chem.* **267**: 8097

Sequenzen der *wt-ecoRI*-Gene mit Hexahistidintag (**fett**) und *StrepTag II* (*kursiv*)

ATG <i>fMet 1</i>	TCT	AAT	AAA	AAA	CAG	TCA	AAT	AGG	CTA 10
ACT	GAA	CAA	CAT	AAG	TTA	TCT	CAA	GGT	GTA 20
ATT	GGG	ATT	TTT	GGG	GAT	TAT	GCA	AAA	GCT 30
CAT	GAT	CTC	GCT	GTT	GGT	GAG	GTT	TCA	AAA 40
TAA	GTA	AAG	AAA	GCT	CTT	AGC	AAC	GAA	TAC 50
CCT	CAA	TTA	TCA	TTT	CGA	TAT	AGA	GAT	AGT 60
ATA	AAG	AAA	ACA	GAA	ATA	AAT	GAA	GCT	TTA 70
AAA	AAA	ATT	GAC	CCT	GAT	CTT	GGC	GGT	ACT 80
TTA	TTT	GTT	TCA	AAT	TCC	AGC	ATC	AAA	CCT 90
GAT	GGT	GGA	ATT	GTA	GAG	GTC	AAA	GAT	GAT 100
TAT	GGT	GAA	TGG	AGA	GTT	GTA	CTT	GTT	GCT 110
GAA	GCC	AAA	CAC	CAA	GGT	AAA	GAT	ATT	ATA 120
AAT	ATA	AGG	AAT	GGT	TTG	TTA	GTT	GGG	AAA 130
AGA	GGA	GAT	CAA	GAT	TTA	ATG	GCT	GCT	GGT 140
AAT	GCT	ATC	GAA	AGA	TCT	CAT	AAG	AAT	ATA 150
TCA	GAG	ATA	GCG	AAT	TTT	ATG	CTC	TCT	GAG 160
AGC	CAC	TTT	CCT	TAC	GTC	CTT	TTC	TTA	GAG 170
GGG	TCT	AAC	TTT	TTA	ACA	GAA	AAT	ATC	TCA 180
ATA	ACA	AGA	CCA	GAT	GGA	AGG	GTT	GTT	AAT 190
CTT	GAG	TAT	AAT	TCT	GGT	ATA	TTA	AAT	AGG 200
TTA	GAT	CGA	CTA	ACT	GCA	GCT	AAT	TAT	GGA 210
ATG	CCT	ATA	AAT	AGT	AAT	CTA	TGT	ATT	AAC 220
AAA	TTT	GTA	AAT	CAT	AAA	GAC	AAA	AGC	ATT 230
ATG	CTA	CAA	GCA	GCA	TCT	ATA	TAT	ACT	CAA 240
GGA	GAT	GGG	AGG	GAG	TGG	GAT	TCG	AAA	ATC 250
ATG	TTT	GAA	ATA	ATG	TTT	GAT	ATA	TCA	ACG 260
ACT	TCG	CTC	AGA	GTG	TTG	GGG	CGT	GAC	TTG 270
TTT	GAA	CAG	CTT	ACT	AGT	AAG	<b>CAT</b> <i>TGG</i>	<b>CAC</b> <i>AGC</i>	<b>CAT</b> <i>CAC</i>
<b>CAC</b> <i>CCG</i>	<b>CAT</b> <i>CAG</i>	<b>CAC</b> <i>TTC</i>	GAA	TTT	TGA <i>Stop</i>				





## LEBENS LAUF

Name: Petra Vennekohl  
Anschrift: Sadebuschstraße 7  
30419 Hannover  
Geburtsdatum: 04.06.1971 in Hannover/Langenhagen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### *Werdegang*

seit März 1996 Promotion im Institut für Biophysikalische Chemie  
an der Medizinischen Hochschule Hannover

Dezember 1996 Betreuung des Praktikums Physiologische Chemie  
bis Dezember 1999 (Teil Nukleinsäuren) des Studiengangs Medizin  
an der Medizinischen Hochschule Hannover

Juni 1995 bis Januar 1996 Diplomarbeit im Institut für Biophysikalische  
Chemie an der Medizinischen Hochschule  
Hannover  
„Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für  
die Stabilisierung der dimeren Restriktionsendo-  
nuklease *EcoRI*“  
Abschluß als Dipl. Chem.

Oktober 1990 Studienbeginn an der Universität Hannover im  
Fach Chemie, Studienschwerpunkt Biochemie

Mai 1990 Allgemeine Hochschulreife

1983 bis 1990 Scharnhorstgymnasium Hildesheim

1981 bis 1983 Orientierungsstufe Nordstemmen

1977 bis 1981 Grundschule Nordstemmen

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

Hannover, 30. November 1999

Petra Vennekohl