

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Regulation der Enzymaktivität der Restriktionsendonuklease EcoRII durch Autoinhibition

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl. Biol. Michal Szczepek

Dekan: Prof. Dr. Andreas Herrman

Gutachter: 1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger
 2. Prof. Dr. Christian Spahn
 3. Prof. Dr. Peter Friedhoff

eingereicht: 28.08.2010

Datum der Promotion: 17.02.2011

Zusammenfassung

DNA-Restriktions- und Modifikationssysteme sind in Prokaryoten weit verbreitet und stellen einen wirksamen Schutz gegen das Eindringen mobiler genetischer Elemente dar. Sie kodieren für eine Restriktionsendonuklease (REase) und eine DNA-Methyltransferase (MTase) gleicher Nukleotidsequenz Spezifität. Die MTase methyliert die zelluläre DNA und schützt sie durch diesen epigenetischen Marker vor der Wirkung der REase. Die REase verhindert die Aufnahme fremder, unmethylierter DNA durch sequenzspezifische Spaltung. EcoRII ist eine REase, die für die effiziente DNA-Spaltung mindestens zwei Kopien ihrer Erkennungssequenz benötigt. Untersuchungen der EcoRII-Struktur und -Funktion offenbarten, dass das Protein aus zwei stabilen Domänen aufgebaut ist, wobei die N-terminale Domäne wie ein Repressor die C-terminale Domäne sterisch blockiert und deren katalytische Aktivität verhindert. Dieser als Autoinhibition bezeichnete und von eukaryotischen Proteinen gut bekannter Regulationsmechanismus wurde erstmals für eine REase vorgeschlagen. In dieser Arbeit konnten wir die Regulation der EcoRII-Enzymaktivität durch Autoinhibition auf molekularer Ebene beweisen. Wir identifizierten β -Strang 1 (B1: 18YFVYIKR24) und α -Helix 2 (H2: 26SANDT30) als essenzielle inhibitorische Elemente der N-terminalen Domäne des EcoRII-Moleküls. Die Deletion von B1 oder H2 führte zu einer vollständigen Aufhebung der Autoinhibition. Darüber hinaus ist es uns gelungen, die 3D-Röntgenkristallstruktur von EcoRII mit 1,9 Å zu lösen und mit Hilfe von Computermodellen neue Interaktionen des Enzyms mit der DNA „minor groove“ zu beschreiben sowie eine Mg^{2+} -Bindungstasche zu charakterisieren. Die Untersuchung der EcoRII-MTase durch limitierte Proteolyse zeigte, dass das Enzym in Abhängigkeit von der DNA-Sequenz und von seinen Kofaktoren, DNA auf unterschiedliche Weise binden kann. Kristallisierungsversuche der EcoRII-MTase in Anwesenheit der hemimethylierten DNA-Erkennungssequenz ergaben erste diffraktierende Kristalle, deren Qualität optimiert werden muss und zur Strukturlösung führen soll.

Schlagwörter: Autoinhibition, EcoRII, Kristallstruktur, Methyltransferase, Restriktionsendonuklease

Abstract

Restriction and modification systems are wide spread among prokaryotes and present an efficient protection against invasion of mobile genetic elements. In general, they code for a restriction endonuclease (REase) and a DNA-methyltransferase (MTase) of the same DNA specificity. The MTase methylates the cellular DNA and by this epigenetic marker protects it against the action of the REase. The REase prevents the entry of foreign unmethylated DNA by site-specific cleavage. EcoRII is an REase which needs at least two copies of the recognition sequence for efficient cleavage. Investigations of the EcoRII structure and function revealed that the protein is composed of two stable domains: the N-terminal domain acts as a repressor by sterically blocking the C-terminal domain and thereby inhibiting its catalytic activity. This regulatory mechanism is known as autoinhibition and has been often described for eukaryotic proteins, but for the first time was proposed for a REase. In this work, we verified the regulation of the EcoRII enzyme activity by autoinhibition at the molecular level. We identified β -strand 1 (B1: 18YFVYIKR24) and α -helix 2 (H2: 26SANDT30) as essential inhibitory elements of the N-terminal domain. Deletion of B1 or H2 caused a complete abolishment of the autoinhibition. Furthermore, we were able to solve the 3D-X-ray crystal structure of EcoRII at 1.9 Å. Based on computer modelling we discovered new interactions between EcoRII and the DNA minor groove and defined the position of the Mg^{2+} binding pocket. Investigations of the EcoRII MTase by limited proteolysis showed that the enzyme binds DNA depending on DNA sequence and cofactors in different manners. Crystallography experiments with EcoRII MTase in the presence of hemimethylated recognition site DNA showed for the first time diffracting crystals which need further optimisation to create high quality crystals which allow structure solution.

Keywords: autoinhibition, crystal structure, EcoRII, methyltransferase, restriction enzyme

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract 3	
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Klassifizierung von Restriktionsendonukleasen	9
1.2 EcoRII, eine ganz typische Restriktionsendonuklease?	12
1.3 Funktion und Struktur von DNA-Methyltransferasen	14
1.4 M.EcoRII, die Charakterisierung einer DNA-Methyltransferase	16
2 Methoden	18
2.1 Bakterienanzucht und Proteinreinigung über Nickel-Nitrilotriacetic acid (NI-NTA)- Affinitätschromatographie.....	18
2.2 Plasmid-DNA Reinigung.....	19
2.3 Ortsspezifische Mutagenese	19
2.4 Titration von EcoRII-N in trans	20
2.5 DNA-Spaltaktivität durch Substitutions- und Deletionsmutanten von EcoRII.....	20
2.6 DNA-Spaltaktivität in Anwesenheit von synthetischen Peptiden.....	20
2.7 Berechnungen der freien Energie mit FoldX	21
2.8 Circular Dichroismus-Spektroskopie.....	21
2.9 Limitierte Proteolyse von M.EcoRII	22
2.10 Western-Blot Experimente	23
2.11 Test der DNA-Methylierungsaktivität	23
2.12 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	23
2.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	24
2.14 Präparation der proteolytischen M.EcoRII-Fragmente für die massenspektrometrische Analyse	25
2.15 Kristallisation der Restriktionsendonuklease EcoRII	25
2.16 Kristallisation der EcoRII-Methyltransferase mit hemi-methylierter DNA.....	26
2.17 Herstellung des Computermodells von EcoRII mit DNA.....	26
2.18 Berechnung der strukturellen Standardabweichung zwischen der neuen EcoRII- ,R88A- und Ko- Kristallstruktur.....	27

2.19	Sequenzvergleich.....	27
2.20	Strukturabbildungen	27
3	Ergebnisse	28
3.1	<u>Untersuchung des molekularen Mechanismus der Autoinhibition von EcoRII</u>	28
	<u>Die Zugabe von EcoRII-N in trans zeigte einen starken inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von EcoRII-C</u>	28
	<u>Substitutionen einzelner Aminosäuren in den vorhergesagten Interdomänen-Kontaktstellen führten zu einer Abschwächung der Autoinhibition</u>	29
	<u>Synthetische Peptide zeigten in trans einen starken inhibitorischen Effekt auf die durch EcoRII-C vermittelte DNA-Spaltung</u>	32
	<u>Identifizierung der minimalen inhibitorischen Region aus Peptid 1 zeigte, dass β-Strang B1 und α-Helix H2 für die Autoinhibition verantwortlich sind</u>	35
3.2	<u>Die Röntgenstruktur des nativen EcoRII-Enzyms bei einer Auflösung von 1.9 Å lieferte neue Erkenntnisse über die DNA- und Mg^{2+}-Bindung</u>	38
	<u>Vergleich der neuen EcoRII-WT mit der R88A-Mutantenstruktur zeigt Unterschiede in der Dimerkonformation</u>	38
	<u>Charakterisierung einer neuen Mg^{2+}-Bindungstasche</u>	40
	<u>Der Vergleich der Mg^{2+}-Bindungstasche von EcoRII und NgoMIV offenbart einen unterschiedlichen Mg^{2+}-Bindungsmechanismus</u>	41
	<u>Berechnung eines EcoRII-C/DNA-Modells in der katalytisch aktiven Konformation</u>	43
	<u>Berechnung eines EcoRII/DNA-Modells in der katalytisch inaktiven Konformation</u>	45
	<u>Untersuchung der Interaktion von EcoRII mit der „kleinen Furche“ der DNA</u>	46
	<u>Funktionelle Bedeutung des “minor groove” Bindungsmotives in EcoRII</u>	49
3.3	<u>Biochemische und strukturelle Untersuchung der EcoRII DNA-Methyltransferase</u>	50
	<u>Klonierung, Überexpression und Reinigung der EcoRII DNA-Methyltransferase</u>	50
	<u>Charakterisierung der Aktivität von M.EcoRII sowie der verkürzten Mutantenzyme M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512</u>	51
	<u>Charakterisierung der DNA-Bindung von M.EcoRII, M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512 mittels EMSA</u> ⁵³	
	<u>Proteolytische Spaltung von M.EcoRII zur Bestimmung von stabilen Domänen in Anwesenheit von verschiedenen DNA-Sequenzen und unterschiedlichen Kofaktoren</u>	55
	<u>Identifizierung der tryptischen Peptide mittels Massenspektrometrie und Western-Blot</u>	57
	<u>Kristallisation von M.EcoRII</u>	58
4	Diskussion.....	60
4.1	Molekulare Charakterisierung der minimalen regulatorischen Einheiten von EcoRII, die für die Autoinhibition verantwortlich sind	60
4.2	Die Röntgenstruktur des nativen EcoRII-Enzyms bei einer Auflösung von 1.9 Å offenbarte eine neue Mg^{2+} -Bindungstasche und Wechselwirkungen des Enzyms mit der „kleinen DNA-Furche“	66
4.3	Charakterisierung von M.EcoRII mit Hilfe von biochemischen und kristallographischen Methoden.....	73
	Literaturverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis.....	90
Danksagung	91
Eigene Publikationen zum Thema	92
Selbständigkeitserklärung.....	93

1 Einleitung

Restriktions- und Modifikationssysteme (R/M-Systeme) bilden eine sehr interessante, weit gefächerte und vielschichtige Enzymfamilie, die in viele Typen mit zahlreichen Subgruppen unterteilt ist. Die R/M-Systeme bestehen dabei meist aus einer DNA-Methyltransferase (MTase) und einer Restriktionsendonuklease (REase) mit gleicher DNA-Sequenzspezifität. Die Gene für ein R/M-System befinden sich dabei in einem Operon und werden oft auf Plasmiden, Prophagen und chromosomal kodiert. R/M-Systeme sind unter diversen Bakterien und Archaea weit verbreitet. Dabei besitzen beide Enzyme eines R/M-Systems die gleiche DNA-Sequenzspezifität, so dass eine zuvor erfolgte DNA-Methylierung der Erkennungssequenz durch die spezifische DNA-Methyltransferase eine Spaltung durch die dazugehörige Restriktionsendonuklease verhindert. Bereits 1979 wurden durch Werner Arber R/M-Systeme als ein bakterielles Abwehrsystem gegen Phagen entdeckt und charakterisiert [1]. Durch das sequenzspezifische Schneiden ungeschützter, zellfremder DNA verhindern die R/M-Enzyme das unkontrollierte Eindringen von genetischem Material in die Zelle. Die Einschränkung eines Eindringens und Austausches von DNA-Fragmenten wirkt dabei auch als eine Art „Evolutionbremse“, die einen unkontrollierten Gentransfer verlangsamt.

Die Rolle, als eine Art Immunsystem zu funktionieren, wird durch die Tatsache bekräftigt, dass Prokaryoten ständigen Angriffen von Phagen ausgesetzt sind, gegen die sie effiziente Abwehrmechanismen entwickelt haben. Man schätzt das globale Vorkommen von prokaryotischen Zellen auf 10^{30} , denen etwa 10^{31} Phagen-Partikel gegenüberstehen. Dabei rechnet man weltweit mit 10^{25} stattfindenden Infektionen pro Sekunde [2,3]. Die Tatsache, dass heute rund 4000 verschiedene REasen beschrieben worden sind, die zudem etwa 300 unterschiedliche DNA-Sequenzen in nahezu allen prokaryotischen Organismen repräsentieren, unterstreicht ihre wichtige Rolle während der Evolution der Organismen [4]. Dabei haben sich neben der allgemein anerkannten Meinung, dass R/M-Systeme ein primitives Abwehrsystem gegen mobile genetische Elemente darstellen, einige interessante neue Hypothesen etabliert.

Eine Theorie, welche das zahlreiche Auftreten der R/M-Systeme erklären soll, bezieht sich dabei auf die Beobachtung, dass Zellen, die R/M-Gene bei der Teilung verlieren, aufgrund von Doppelstrangbrüchen zugrunde gehen [5]. Der Grund dafür ist, dass bei der Zellteilung außer den DNA-Molekülen auch alle anderen Zellkomponen-

ten gleichermaßen aufgeteilt werden, somit auch die REase- und MTase- Proteine. Verliert eine der Zellen die R/M-Gene, so kann sie ihre eigene DNA vor Restriktion nicht mehr effizient schützen, da für einen vollständigen Schutz alle genomischen Erkennungsorte methyliert werden müssen; schon ein einziger Doppelstrangbruch kann den Untergang der Zelle verursachen. Diese Eigenschaft der R/M-Systeme wird dabei als egoistisch bezeichnet, da der Fortbestand der eigenen Gene und die Verbreitung der eigenen Erbinformation im Vordergrund stehen.

Aufgrund des ständigen Selektionsdrucks, den die R/M-Systeme ausüben, stellen sie aber gleichermaßen sicher, dass fremde DNA nur eingeschränkt aufgenommen werden kann. Die Beziehung der R/M-Gene zu ihrer Wirtszelle kann dabei als eine Art „Symbiose“ betrachtet werden, da die Wirtszelle zwar gezwungen ist die Expression der R/M-Gene um jeden Preis aufrecht zu halten, andererseits genießt sie den Schutz vor fremder DNA. Diese Eigenschaften können den Siegeszug der R/M-Systeme im Reich der Prokaryoten erklären, da eine Zelle dem durch das R/M-System auferlegten Selektionsdruck nur durch eine inaktivierende Mutation des Restriktionsgens entfliehen könnte. Eine vergleichende Analyse von bakteriellen Genomen unterstützt diese Theorie und zeigt, dass Bakteriengenome statistisch betrachtet nur über wenige palindromische Sequenzen verfügen und somit eine Kontraselektion gegen mögliche Restriktionsstellen durchlaufen [6]. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass palindromische Sequenzen häufig von REasen erkannt werden.

Diese Art eines Abhängigkeitssyndroms ist bei Bakterien weit verbreitet und im Falle eines Toxin–Antitoxin-Systems (TA-System) für den Wirtsorganismus oft von großem Vorteil, da bei einer Ko-Lokalisation eines TA-Systems und eines Resistenzgens auf demselben Plasmid, der Verbleib dieser Resistenzgene in einer Population gewährleistet wird. So können Fähigkeiten übertragen werden, die die Bildung von ökologischen Nischen ermöglichen [7,8]. Ein klassisches Toxin-Antitoxin-System besteht aus einem Toxin-Gen, das für ein stabiles Protein kodiert, sowie einem Antitoxin-Gen, das eine Toxin-neutralisierende, antisense RNA bildet oder für ein labiles Antitoxin-Protein kodiert. Das bekannteste TA-System bildet der *hok-sok* Locus des R1 Plasmids in *Escherichia coli* (*E.coli*) [9,10,11]. Der Vergleich eines R/M- mit einem TA-System zeigt, dass beide Systeme darauf gerichtet sind, den Verbleib der eigenen Gene in der Population zu sichern. Beide Systeme nutzen dabei den Effekt des „post-segregational killing“, um einen starken Selektionsdruck auf den Verbleib der eigenen

Gene in der Zelle auszuüben. Bei einer Gegenüberstellung von R/M- und TA-Systemen entspricht die REase dem Toxin und die MTase dem Antitoxin. Die Bezeichnung von R/M-Systemen als egoistische Elemente ist durchaus berechtigt und vergleichbar mit den ebenfalls egoistischen TA-Systemen, Homing Endonukleasen und anderen mobilen genetischen Elementen.

Die Beobachtung, dass R/M-Gene oft von invertierten repetitiven Sequenzen flankiert werden, unterstützt die Theorie, dass R/M-Systeme durch Rekombinationsereignisse zwischen unterschiedlichen genetischen Elementen ausgetauscht werden können [7,12]. Sie dienen somit auch als treibende Kraft für den horizontalen Gentransfer [5,13,14]. R/M-Systeme können ebenfalls eine wichtige Rolle bei dem Erwerb neuer Fähigkeiten und der damit verbundenen Vergrößerung des eigenen Genpools spielen. Dabei wird die ungeschützte fremde DNA durch die Restriktionsendonukleasen gespalten, so dass die entstehenden Fragmente über illegitime oder homologe Rekombination in das eigene Genom aufgenommen werden können [15].

Durch die Fähigkeit der REasen, DNA zu spalten, mehrere DNA-Stränge gleichzeitig zu binden und auch DNA-Schlaufen ausbilden zu können, ist eine direkte Beteiligung von REasen an Rekombinationsereignisse zwar durchaus denkbar, bis heute jedoch nicht direkt bewiesen. Einen interessanten Mechanismus in einigen R/M-Systemen stellt das Phänomen der „Phasenvariation“ dar, bei dem durch Rekombinations- und Inversionsereignisse innerhalb der R/M-Gene neue DNA-Substratspezifitäten entstehen [16]. Durch diesen Mechanismus sind die R/M-Systeme in der Lage, der Kontraselektion der Erkennungssequenzen in Phagengenomen entgegenzusteuern [17]. Große Bedeutung in der Medizin haben die Ereignisse der „Phasenvariation“, bei denen Veränderungen der Genexpression zur Entstehung pathogener Bakterienstämme führen [18].

1.1 Klassifizierung von Restriktionsendonukleasen

REasen können aufgrund ihrer Untereinheiten, DNA-Sequenzspezifität, Kofaktorabhängigkeit sowie ihres Reaktionsmechanismus in drei wichtige Typen unterteilt werden (Typ I, II und III) [19,20,21]. Von rund 4000 charakterisierten REasen fallen 98% auf den Typ II, die verbleibenden 2% auf Typ I und Typ III [4]. Typ II-REasen sind im Allgemeinen als Homodimere organisiert, die in Anwesenheit von Mg^{2+} beide Stränge der DNA in einer koordinierten Aktion innerhalb einer, meist palindromen DNA-

Erkennungssequenz spezifisch spalten. Die Diversität innerhalb der Typ II-REasen wurde durch zahlreiche biochemische und strukturelle Untersuchungen verschiedener REasen des Typs II in den letzten Jahren deutlich. Die als homogen vermutete Gruppe der Typ II-REasen stellte sich bei einer genauen Betrachtung als eine sehr heterogene Population heraus, die eine zusätzliche Klassifizierung notwendig machte (Abb. 1).

Die Gruppe der Typ II-REasen wird in mehrere Subtypen unterteilt. Der Subtyp A ist durch eine asymmetrische Erkennungssequenz im DNA-Molekül charakterisiert. Zu den Vertretern der A-Subtypen zählt u.a. FokI. Der Subtyp B zeichnet sich durch die Spaltung auf beiden Seiten in jeweils beiden Strängen der Erkennungssequenz aus (z.B. Bcgl). Der Subtyp C ist gekennzeichnet durch eine Lokalisation der beiden R/M-Funktionsmodule auf demselben Polypeptid, beispielweise GsuI. Die Enzyme des Subtyps E brauchen für eine effiziente DNA-Spalten nur einen der beiden Erkennungsorte, wobei der andere als Effektor dient. Zu diesem Subtyp zählt auch EcoRII. Der Subtyp F weist eine konzertierte Spaltung der beiden Erkennungsorte auf (z.B. SfiI). Die Enzyme des Subtyps G benötigen den Kofaktor AdoMet zur DNA-Spaltung (BsgI und Eco57I). Der Subtyp H wird durch eine zum Typ I identische Genstruktur charakterisiert (z.B. AhdI). Die Enzyme der Subgruppe M bilden eine neue Gruppe, bei der eine Methylierung der Erkennungssequenz für eine effiziente

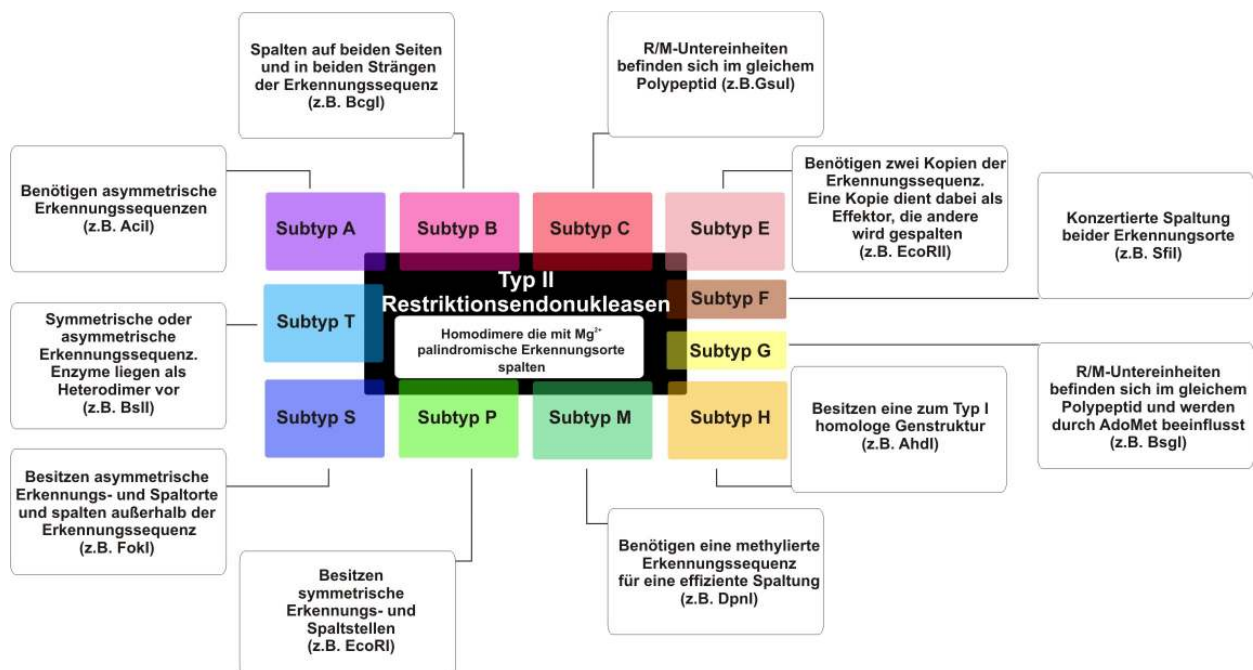


Abbildung 1: Übersicht über die unterschiedlichen Subtypen von Typ II-Restriktionsendonukleasen und ihre Eigenschaften

Spaltung Voraussetzung ist (Dpnl). Der Subtyp P zeichnet sich durch eine symmetrische Erkennungs- und Spaltstelle aus (z.B. EcoRI). Die Enzyme des Subtyps S besitzen einen asymmetrischen Erkennungs- und Spaltort. Zu diesem Subtyp zählen die meisten Typ II-Enzyme. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind AarI und MmeI. Der Subtyp T wird von REasen gebildet, die eine symmetrische oder asymmetrische DNA-Erkennungssequenz besitzen und deren REasen als Heterodimere vorliegen (z.B. BspI). Die Entdeckung, Charakterisierung und Nutzung von REasen hat in den vergangenen Jahrzehnten viele Zweige der Naturwissenschaft und Medizin vorangetrieben. Ihre Nutzung als molekularbiologische Werkzeuge hat die Wissenschaft und Medizin der vergangenen Jahrzehnte geprägt und vielen Fachrichtungen zum Durchbruch verholfen. Die kommerzielle Verfügbarkeit von REasen für mehr als 200 spezifische DNA-Sequenzen hat alle molekularbiologischen Fachrichtungen geformt und das Verständnis von vielen zellulären Prozessen verbessert. Zunehmend wächst aber auch die Bedeutung von R/M-Systemen in der Medizin als Determinante der bakteriellen Virulenz [22,23]. Die Verwendung von REasen zum Zweck der Gentherapie wird ebenfalls seit mehreren Jahren untersucht [24,25].

Bei der Gentherapie könnten fehlerhafte Gene durch gezielt gesetzte Doppelstrangbrüche ausgeschaltet oder durch die Zugabe einer korrekten Genkopie mittels homologer Rekombination ausgetauscht werden [26].

Eine offene Frage besteht darin, wie REasen ihre hohe Genauigkeit in der sequenzspezifischen Erkennung erreichen. Bis jetzt sind bereits Kristallstrukturen von 36 Typ II-REasen gelöst worden, welche einen Einblick in die funktionellen Mechanismen der DNA-Erkennung und -Spaltung erlauben. In den vorhandenen Strukturen konnten konservierte Sekundärstrukturen, wie das als „Core“ bezeichnete katalytische Element erkannt werden, welches aus 5-strängigen β -Faltblättern sowie flankierenden α -Helices besteht [20]. Dieses endonukleolytische „Core“-Element ist bei zahlreichen Proteinen verschiedener Spezies identifiziert worden; zu diesen zählen das Vsr-Protein (very short patch repair), das MutH-Protein, Homing-Endonukleasen, die „cap-snatching“- Endonuklease vom Influenzavirus sowie die Alkaline Exonuclease des Herpesvirus [27,28,29,30,31,32]. Im Gegensatz dazu sind die an der DNA-Bindung beteiligten Domänen unterschiedlich aufgebaut. Die DNA-Bindung erfolgt bei vielen REasen auf einzigartige Weisen.

1.2 EcoRII, eine ganz typische Restriktionsendonuklease?

Bei der Untersuchung klinischer Isolate von *E. coli* in den Jahren 1968 bis 1972 entdeckten die Wissenschaftler D. Bannister und S.W.Glover ein Restriktionssystem, das die Vermehrung des λ -Phagen einschränkt [33,34] und das heute als EcoRII-R/M System bezeichnet wird. Die EcoRII-Restriktionsendonuklease erkennt die unmethylierte DNA-Sequenz 5'CC(A/T)GG 3' und spaltet die Phosphodiesterbindung vor dem ersten Cytidin der Sequenz [35]. Die Gene für das EcoRII-R/M-System wurden 1980 kloniert [36]. Bereits 1982 wurden die Proteine isoliert und erstmals untersucht [36,37]. Bei der Untersuchung der Genstruktur des EcoRII-R/M-Systems stellte sich heraus, dass die R/M-Gene in einer konvergenten Orientierung von verschiedenen Strängen transkribiert werden. Die beiden offenen Leserahmen werden dabei von verschiedenen Promotoren kontrolliert. Das *ecoRII*-Gen kodiert dabei für ein 45,6 kD großes Protein, wobei das *mecoRII*-Gen für ein 58 kD großes Protein kodiert [38,39].

Bei späteren biochemischen Untersuchungen in den folgenden Jahren sind weitere interessante Details aufgedeckt worden. Es konnte gezeigt werden, dass T3 und T7 Phagen-DNA trotz vorhandener EcoRII-Erkennungssequenzen nicht gespalten werden konnte. Erst nach der Zugabe von DNA-Fragmenten mit der EcoRII-Erkennungssequenz *in trans* wurde EcoRII aktiviert und die Phagen-DNA vollständig gespalten [40]. Es stellte sich heraus, dass die Distanz zwischen den Erkennungsorten den limitierenden Faktor für die EcoRII vermittelte Spaltung darstellt. Diese Feststellung gilt grundsätzlich bei EcoRII sofern sich die Erkennungsorte, die für die Spaltung benötigt werden auf einem DNA-Molekül befinden [41].

Bei einem Sequenzvergleich von EcoRII und Rekombinasen zeigte sich eine evolutionäre Verwandtschaft. Die Substitution von Tyrosin 308 zu Phenylalanin in EcoRII schaltete das katalytische Zentrum vollständig aus, ohne die DNA-Bindung dabei zu beeinflussen. Da diese Position bei Rekombinasen eine hochkonservierte, funktionell wichtige Position darstellt, wurde eine enge Verwandtschaft zwischen EcoRII und Rekombinasen postuliert [42].

Bei weiteren Untersuchungen des EcoRII-Reaktionsmechanismus ist festgestellt worden, dass trotz einer eingefügten Barriere (Lac-Repressor) zwischen den EcoRII-Erkennungsorten eine vollständige DNA-Spaltung stattfindet. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass EcoRII mit zwei Erkennungsorten durch die Ausbindung von DNA-Schlaufen interagiert [43]. Die Formation von DNA-Schlaufen durch EcoRII

wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt, wobei DNA-Schlaufen sichtbar gemacht werden konnten [44].

Einen großen Schritt bei der Klärung des EcoRII-Reaktionsmechanismus lieferten Experimente mit synthetischen, membrangebundenen Peptiden, die überlappend die vollständige EcoRII-Aminosäure Sequenz darstellten. Dabei wurden diese Membranen mit kurzen synthetischen Oligonukleotiden inkubiert, die die EcoRII-Erkennungssequenz enthielten. Es zeigte sich dabei, dass die Aminosäuren 88-102 und 256-273 an der DNA-Bindung beteiligt sind und somit zwei DNA-Bindungsdomänen wahrscheinlich sind [45].

Einen Meilenstein bei der Untersuchung von EcoRII lieferten die Ergebnisse der proteolytischen Spaltexperimente. Dabei wurde bestätigt, dass EcoRII aus zwei Domänen besteht, die jeweils unabhängig voneinander spezifisch DNA binden können. Die C-terminale Domäne (EcoRII-C) besitzt die katalytische Aktivität, wohingegen die N-terminale Domäne (EcoRII-N) nur DNA binden kann. Die Abtrennung der N-terminalen Domäne von EcoRII führte dabei zu einer Aktivierung der Spaltaktivität, bei der Substrate mit nur einem Erkennungsort effizient gespalten werden konnten [46]. „Photo-cross-linking“-Experimente identifizierten den direkten Kontakt von Aminosäure Tyr41 in der N-terminalen Region mit dem 5'C der 5'CCA/TGG Erkennungssequenz [47].

Einen großen Erkenntniszugewinn brachte die Lösung der EcoRII-Mutantenstruktur R88A, die vermuten ließ, dass EcoRII über einen Autoinhibitionsmechanismus, „eine Art molekularen Schalter“, reguliert wird. Dabei blockieren in Abwesenheit von spezifischer DNA die N-terminalen EcoRII-Domänen sterisch das katalytische Zentrum, das aus den beiden C-terminalen Domänen gebildet wird. In Abwesenheit von DNA müssen zunächst die EcoRII-N Domänen durch eine Aktivator-DNA besetzt werden, um dann nach Konformationsänderungen die EcoRII-C Domäne für ein zweites DNA-Molekül zugänglich zu machen, das gespalten werden kann [48]. Autoinhibition als Mechanismus der Regulation von Enzymaktivität war bisher nur für eukaryotische Signaltransduktionsproteine und Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, für Restriktionsendonukleasen war sie dagegen völlig unbekannt. Andere Autoren publizierten ein Modell, das sogar die gleichzeitige Bindung von drei DNA-Molekülen für eine Spaltreaktion von EcoRII voraussetzt [49]. Die Darstellung entsprechender dreifacher synaptischer Komplexe mittels Transmissionselektronenmikroskopie gelang

den Autoren allerdings nur in einem sehr geringen prozentualen Anteil innerhalb der untersuchten Population [50]. Gegen die gleichzeitige Bindung von drei DNA-Erkennungsorten durch EcoRII sprechen neuere FRET Untersuchungen mit Fluoreszenz markierten linearen DNA-Molekülen [51].

Bei der Untersuchung des DNA-Bindungsmechanismus von EcoRII-C eröffnete sich ein weiterer neuer Aspekt der DNA-Erkennung bei REasen. Interessanterweise erhalten die Enzyme durch das „Herausflippen“ der zentralen Base aus der Erkennungssequenz zusätzliche Spezifität, ein Mechanismus, der bis dahin nur für DNA-Methyltransferasen bekannt war [52]. EcoRII gehört damit zu einer der ersten REasen, bei der dieser Mechanismus nachgewiesen wurde [53].

Durch die kürzlich gelöste Struktur der separaten N- und C- Domäne von EcoRII im Komplex mit DNA bieten sich zwar neue Einblicke in den DNA-Bindungsmechanismus von EcoRII, ein vollständiges und belastbares Modell für den EcoRII-Reaktionsmechanismus fehlt jedoch [54].

EcoRII kann als ein Prototyp der REasen angesehen werden, der zahlreiche Eigenschaften verschiedener Enzyme in sich vereinigt und viele Fragen über seine evolutive Entstehung aufwirft. Interessanterweise ergab die NMR-Strukturanalyse des pflanzlichen Transkriptionsfaktors RAV1 eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zu der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne von EcoRII [55].

1.3 Funktion und Struktur von DNA-Methyltransferasen

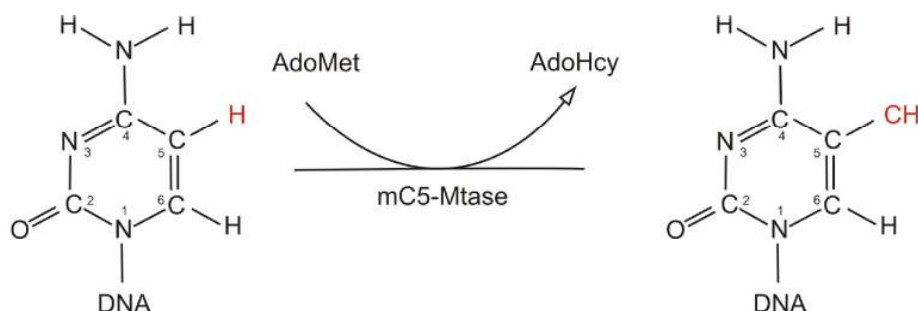


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Methylierung am Beispiel der C5-Methylierung. Position der Methylierung ist rot dargestellt.

DNA-Methyltransferasen katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) zur DNA und hinterlassen dabei S-Adenosyl-L-Homocysteine (AdoHcy) und methylierte DNA (Abb. 2). Dabei können die Positionen

C5 und N4 in Cytosin und N6 in Adenin methyliert werden, während bei Eukaryoten nur die Methylierung der C5-Position weit verbreitet ist, wohingegen in Prokaryoten alle drei Positionen methyliert werden (Abb. 3).

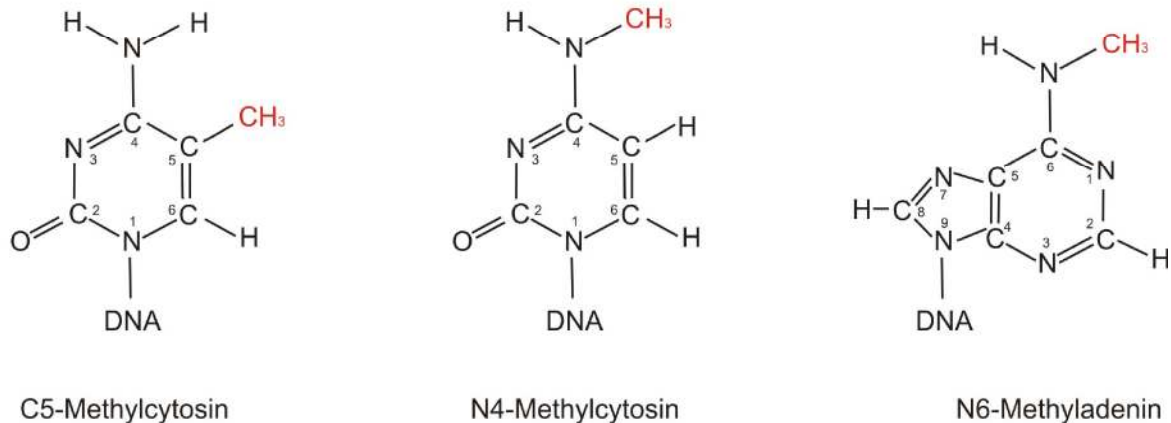


Abbildung 3: Beispiel der verschiedenen Methylierungspositionen. Die Methylgruppen sind in der Grafik jeweils rot dargestellt.

Im Allgemeinen bestehen MTasen aus zwei Domänen, einer kleinen und einer großen [56,57]. In der Kontaktstelle zwischen den beiden Domänen befindet sich die DNA-Erkennungs- und Bindungsregion. Alle Typen von MTasen besitzen eine gemeinsame Struktur, den sogenannten „AdoMet-dependent MTases fold“, der die AdoMet-Binderegion darstellt. MTasen werden in zwei Klassen unterteilt. Die exozyklischen MTasen übertragen die Methylgruppe auf die Position N4 im Cytosin oder N6 in Adenin, die endozyklischen MTasen, auf die Positionen C5 in Cytosin (Abb. 3).

Bei einer Untersuchung der Primärstruktur von C5-Cytosin MTasen sind konservierte Motive (I-X) entdeckt worden, die in einer linearen Form vorliegen [58,59]. Die Motive I, II und III sind bei allen Methyltransferasen eindeutig als AdoMet-Bindemotive charakterisiert worden, wobei die Motive II und III nicht so konserviert sind wie Motiv I [57,60,61,62]. Das Motiv IV (Aminosäure Sequenz PCQ bei C5- und DPPY bei N6 - Methyltransferasen) ist für den Transfer der Methylgruppe essentiell. Mutationen dieser Region resultieren in einem vollständigen Aktivitätsverlust [63,64]. Für Motiv V konnte ebenfalls eine Funktion in der AdoMet-Bindung gezeigt werden [65]. Für die Motive VI und VII sind noch keine eindeutigen Funktionsvorhersagen getroffen worden, wohingegen die Motive VIII und IX wegen einer hohen Variabilität innerhalb der Sequenz unter den Methyltransferasen als DNA-Erkennungsmotive (Target recognition domain) beschrieben werden konnten [66,67]. Motiv X übernimmt eine Rolle bei der Ausbildung der AdoMet-Bindetasche [56]. Bei einem Vergleich von exo- und en-

dozyklischen DNA-Methyltransferasen zeigte sich überraschend eine hohe Übereinstimmung im Bereich des katalytischen Zentrums, was auf eine enge Verwandtschaft dieser beiden Enzymgruppen hindeutet [65].

MTasen verfügen über die Fähigkeit die zu methylierende Base aus dem DNA-Strang um 180° „herauszuflippen“, um dadurch ihre Spezifität zu erhöhen und den Transfer der Methylgruppe zu ermöglichen [52]. Der erste Schritt bei der Methylierungsreaktion ist die sequenzspezifische Bindung an die DNA. Nach Kofaktorbindung und dem „Herausflippen“ der zu methylierenden Base wird die Methylgruppe übertragen [68].

MTasen erfüllen in pro- und eukaryotischen Zellen zahlreiche wichtige Funktionen. Sie kontrollieren die Transkription, nehmen Einfluss auf die posttranslationalen Reparaturmechanismen, kontrollieren die DNA-Replikation und den Zellzyklus, übernehmen in R/M-Systemen die Funktion der Antitoxine und schützen den Organismus vor dem Zelltod durch REasen [69,70]. Es sind derzeit rund 8000 eingetragene DNA-MTase Gene in der REBASE Datenbank zu finden, die weit über 300 verschiedene DNA-Sequenzen erkennen [4]. Ihre vielfältigen Aufgaben und ihre hohe strukturelle Diversität machen sie sowohl zu interessanten Modellenzymen bei der Untersuchung von molekularen DNA-Erkennungsprozessen, als auch zu einem biologischen Modell bei der Untersuchung verschiedener zellulärer Mechanismen [61,71].

1.4 M.EcoRII, die Charakterisierung einer DNA-Methyltransferase

M.EcoRII wurde bereits 1973 als Teil eines R/M-Systems beschrieben und 1980 kloniert [35,36]. Bei M.EcoRII handelt es sich um eine endozyklische C5-Cytosin-Methyltransferase, die das zweite Cytosin der C^mCA/TGG- Erkennungssequenz als Monomer methyliert. M.EcoRII verfügt über ein für DNA-MTasen ungewöhnlich großes Molekulargewicht von 58 kD und ist damit rund 30% größer als vergleichbare DNA-MTasen [72]. Als Komponente eines R/M-Systems bildet die DNA-MTase zusammen mit der EcoRII-Endonuklease ein Zweikomponentensystem, das die Zelle vor dem Eindringen fremder DNA schützt. Dabei versieht die EcoRII-MTase die zelluläre DNA mit einem epigenetischen Marker und ermöglicht damit die Unterscheidung zwischen zellfremder und zelleigener DNA.

Wie bereits im Falle der EcoRII-REase diskutiert, verfügt die EcoRII-MTase ebenfalls über besondere Eigenschaften. Eine der ersten biochemischen Untersuchungen

zeigte, dass mit 5-Azacytidin modifizierte DNA zu einer irreversiblen Bindung von M.EcoRII an DNA führt. Ein im Anschluss an die irreversible Bindung durchgeführter proteolytischer Verdau zeigte, dass das gesamte Enzym bis auf die ersten 85 N-terminalen Aminosäuren vor proteolytischem Verdau geschützt wird. Es stellte sich durch Deletionsmutagenese außerdem heraus, dass die ersten 97 Aminosäuren für die Methylierungsaktivität von M.EcoRII nicht essentiell sind [73].

Bei weitergehenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass M.EcoRII die eigene Expression regulieren kann. Dies wurde klar, als man 5-Azacytidin zu einer wachsenden Bakterienkultur gab und feststellte, dass durch die irreversible Bindung an die DNA die Gesamtmenge an M.EcoRII zuerst sank, sich anschließend schnell erholte und letztlich zu einer deutlich erhöhten M.EcoRII-Expression führte. Dieser Effekt ist abhängig vom M.EcoRII-Promotor. Der Austausch des M.EcoRII-eigenen Promotors durch einen anderen Promotor führte dazu, dass die Expression nicht mehr 5-Azacytidin sensitiv war [74]. Diese Ergebnisse konnten auch auf der Transkriptionsebene bestätigt werden [75].

Weitere biochemische Untersuchungen zeigten, dass M.EcoRII direkt an die eigene Promotorsequenz binden kann [74]. Durch DNaseI-Footprinting wurde die für die Bindung notwendige Sequenz auf 47-49 Basenpaare eingeschränkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Repression der Transkription methylierungs-unabhängig ist [76]. Die gezielte Insertion von vier Aminosäuren an der Position 56 führte zu einer Aufhebung der eigenen Transkriptionseinhibition [76,77]. Durch vergleichende Sequenzuntersuchungen mit anschließender Computermodellierung von M.EcoRII und M.HhaI konnte ein erstes 3D-Modell von M.EcoRII erstellt werden, das auf der Struktur von M.HhaI basiert. Das erstellte M.EcoRII-Computermodell und die durchgeführte Analyse zeigten, dass für die ersten 90 Aminosäuren keine Strukturvorhersagen möglich sind [72].

Bei weiteren Studien wurde der DNA-Bindungsmechanismus von M.EcoRII an modifizierten Oligonukleotiden untersucht. Dabei sind die an der Bindung beteiligten Regionen charakterisiert worden und die Aminosäuren Gly268 und Met391 als Interaktionspunkte zwischen M.EcoRII und der DNA bestimmt worden [78,79,80,81].

2 Methoden

2.1 Bakterienanzucht und Proteinreinigung über Nickel-Nitrilotriacetic acid (NI-NTA)-Affinitätschromatographie

Die Proteine mit N-terminalem 6xHis-Tag, EcoRII, EcoRII-N, EcoRII-C, sowie alle anderen EcoRII-Mutantenenzyme wurden in *E. coli* JM109 (pDK1r_{EcoRII}⁻m_{EcoRII}⁺) überexprimiert (Tab.1). Die Methyltransferasekonstrukte M.EcoRII, M.EcoRII 1-113, M.EcoRII 114-512 wurden dagegen in *E. coli* JM109 überexprimiert. Die Überexpression wurde im LB-Medium durchgeführt. Die Induktion erfolgte nach dem Erreichen der notwendigen Zelldichte mit IPTG. Die Zellen sind anschließend durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und mittels (NI-NTA)-Affinitätschromatographie und Heparinagarose gereinigt worden. Für eine detaillierte Beschreibung der Reinigung verweise ich auf folgende Publikationen [43,46]. Für die Kristallisation von M.EcoRII wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt durchgeführt. Die Proteine wurden durch eine Gelfiltration mit der Superdex 200-Säule gereinigt. Bei dieser Gelfiltration enthielt der Puffer 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7,6; 250 mM NaCl₂; 1 mM Dithiothreitol (DTT) und 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Die Proteine wurden mittels SDS-Gel Elektrophorese analysiert und mit Coomassie gefärbt (Serva). Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm unter Einbeziehung des jeweiligen spezifischen Extinktionskoeffizienten berechnet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Mutantenenzyme und Bakterienstämme

Mutantenenzyme	Bakterienstämme	Herkunft
EcoRII	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	[43]
EcoRII-N	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	[46]
EcoRII-C	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	[46]
EcoRII-E145A	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-S173A	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-E351A	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-S354A	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-DH1	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-DB1	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-DH2	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
EcoRII-K376A-K377A	<i>E. coli</i> JM109 (pDK1r _{EcoRII} ⁻ m _{EcoRII} ⁺)	diese Arbeit
M.EcoRII	<i>E. coli</i> JM109	diese Arbeit
M.EcoRII 1-113	<i>E. coli</i> JM109	diese Arbeit
M.EcoRII 114-512	<i>E. coli</i> JM109	diese Arbeit

2.2 Plasmid-DNA Reinigung

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe des „Plasmid Maxi Kit“ bzw. „Plasmid Miniprep Kit“ gereinigt (QIAGEN).

2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Für die Herstellung der EcoRII-Konstrukte wurde das Plasmid pQE-RII, ein Derivat des pQE-30 Expressionsvektors (Qiagen GmbH) als Template verwendet [43]. Für die Herstellung der M.EcoRII-Konstrukte wurde das pDK1 Plasmid verwendet, das das M.EcoRII-Gen beinhaltet (NCBI Referenz Sequenz: YP_724464.1) [45]. Die Mutagenese wurde mit Hilfe des „QuikChange-Mutagenesis-Kit“ von Stratagene durchgeführt. Die EcoRII-Konstrukte wurden im Anschluss an die PCR-Produkte in kompetente *Escherichia coli* JM109 Zellen ($pDK1r_{EcoRII}^{-}m_{EcoRII}^{+}$) transformiert. Die EcoRII-Deletionsmutanten $\Delta H1$, $\Delta B1$, $\Delta H2$ sowie M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 14-512 wurden durch eine PCR konstruiert, bei der die PCR-Primer die zu entfernende Region aussparen und in entgegengesetzter Richtung von dieser Region amplifizieren. Diese PCR-Produkte haben glatte Enden und wurden mit einer T4-Ligase zu zirkulären Konstrukten ligiert. Anschließend wurden *Escherichia coli* JM109 Zellen transformiert. Alle DNA-Konstrukte wurden sequenziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Oligonukleotide, die für die Herstellung der Mutanten verwendet wurden

Mutagenese-Oligonukleotide	Orientierung	Sequenz	Firma
EcoRII E145A	vorwärts	5'-GCCAGCACTGATGAAGCGGACGTCATTGAGACC	Sigma Aldrich
EcoRII E145A	rückwärts	5'-GGTCTCAATGACGTCCGCTTCATCAGTGCTGGC	Sigma Aldrich
EcoRII S173A	vorwärts	5'-GATTCTAGGCGGACTAGCGCTACAGCAAGCGCCAG	Sigma Aldrich
EcoRII S173A	rückwärts	5'-CTGGCGCTTGCTGTAGCGCTAGTCCGCCTAGAATC	Sigma Aldrich
EcoRII E351A	vorwärts	5'-CTGTTTACTACTCCAGGCGGGAGTTTCTCTGGCT	Sigma Aldrich
EcoRII E351A	rückwärts	5'-AGCCAGAGAACTCCCGCCTGGAGTGTAACAG	Sigma Aldrich
EcoRII S354A	vorwärts	5'-GTTTACTACTCCAGGAGGGAGTTGCTCTGGCTCAAT	Sigma Aldrich
EcoRII S354A	rückwärts	5'-ATTGAGCCAGAGCAACTCCCTCCTGGAGTGTAAC	Sigma Aldrich
EcoRII-DH1	vorwärts	5'-AATTACTTCGTCTACATCAAACGCC	BioTeZ
EcoRII-DH1	rückwärts	5'-GTGATGGTGATGGTGATGCGATC	BioTeZ
EcoRII-DB1	vorwärts	5'-CTTCCGCCAACGATACCG	BioTeZ
EcoRII-DB1	rückwärts	5'-ATTCTCACATGCGATCTCAAG	BioTeZ
EcoRII-DH2	vorwärts	5'-GGCGCAACAGGTGGTCACC	BioTeZ
EcoRII-DH2	rückwärts	5'-AAGGCGTTTGATGTAGACGAAG	BioTeZ
EcoRII K376A-K377A	vorwärts	5'-ACGCAGCATACCCGGAGGCGGTGAGAG	Sigma Aldrich
EcoRII K376A-K377A	rückwärts	5'-GCAGAGATGATGGCAACGACCAATCTGA	Sigma Aldrich
M.EcoRII	vorwärts	5'-AAAAGTCGACGATTTCGTTCAACCTTGCACGAATCGGC	Sigma Aldrich
M.EcoRII	rückwärts	5'-AAAAGGATCCATGAGTGATACAGTTTCACCCATAAGA	Sigma Aldrich

M.EcoRII 114-512	vorwärts	5'-ACGGATCCCCTGCACATCACCTGACTATGCCTTCCGG	Sigma Aldrich
M.EcoRII 114-512	rückwärts	5'-TCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGC	Sigma Aldrich
M.EcoRII 1-113	vorwärts	5'-ACAATTTACACAGAATTCTTAAAGAGGAGAAATTA	Sigma Aldrich
M.EcoRII 1-113	rückwärts	5'-AAAAAGCTTCGCTTCCGGAAGCATTTCGTAGAAGTTCC	Sigma Aldrich

2.4 Titration von EcoRII-N in trans

Die 20 µl Ansätze wurden in 1X EcoRII-Reaktionspuffer mit 0,32 pmol EcoRII-C (oder Mval) sowie EcoRII-N (0,32 pmol bis 32 pmol) auf Eis pipettiert und für zehn Minuten vorinkubiert [43]. Durch die Zugabe von 150 ng (0,32 pmol EcoRII Erkennungsorten) von HindIII-linearisierter pBR322 DNA (Dcm⁻) wurde die Reaktion gestartet. Die Ansätze wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Spaltung von pBR322 DNA durch BstNI wurde in 1X NEB2 Puffer mit 100 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend in 1% Agarose-Gelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.5 DNA-Spaltaktivität durch Substitutions- und Deletionsmutanten von EcoRII

Die DNA-Spaltexperimente mit den Substitutionsmutanten EcoRII-E145A, -S173A, -E351A und -S354A wurden mit 300 ng (35,1 fmol EcoRII-Erkennungsorten), die DNA-Spaltexperimente mit den Deletionsmutanten EcoRII-ΔH1, -ΔH2, -ΔB1 mit 400 ng T3 Phagen-DNA (46,8 fmol EcoRII-Erkennungsorten), in 1X EcoRII-Reaktionspuffer durchgeführt. Die Enzyme wurden dabei im Überschuss eingesetzt (siehe jeweilige Abbildungslegende). Die 25 µl Ansätze wurden anschließend für zwei Stunden bei 37° C inkubiert und hinterher durch 0.7% bzw. 0.8% Agarose-Gele getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.6 DNA-Spaltaktivität in Anwesenheit von synthetischen Peptiden

Die synthetischen Peptide wurden bei Genscript Corporation (Piscataway, NJ, USA; <http://www.genscript.com>) hergestellt. Das Peptid 1 entspricht dabei den EcoRII-Aminosäuren 4–33 Sequenz SVFHNWLEIACENYFVYIKRLSANDTGAT und besitzt ein Molekulargewicht von 3475,96 g/mol. Peptid 2 entspricht den EcoRII-Aminosäuren 144–173 Sequenz EEDVIETAIGEVIPGALISGPAGQILGGLS, mit einem Molekulargewicht von 2906,31 g/mol. Peptid 3 repräsentiert eine zufällige Ami-

nosäuresequenz AEYPAHGTRLVKRLQTFVPNKEILCSMDGS, mit einem Molekulargewicht von 3361,93 g/mol. Peptid 1 (0,533 mg) und Peptid 3 (0,631 mg) konnten problemlos in Wasser gelöst werden. Peptid 2 (0,660 mg) konnte nur durch eine tröpfchenweise Zugabe von 7% Ammoniumbikarbonat in Wasser, wie vom Hersteller empfohlen, gelöst werden. Die Peptide wurden auf die gewünschten Konzentrationen mit Wasser verdünnt. Die 20 µl Ansätze wurden durch Zugabe von 1X Reaktionspuffer, 0,64 pmol EcoRII-C (oder 0,07 pmol Mval) sowie der entsprechenden Menge der jeweiligen Peptide auf Eis angesetzt und für zehn Minuten vorinkubiert. Durch Zugabe von 150 ng pBR322 DNA (0,32 pmol EcoRII-Erkennungsorten) wurde die Reaktion gestartet und die Ansätze bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Spaltprodukte wurden anschließend in 1% Agarose-Gelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Um Probleme durch Inkompatibilität von Puffern auszuschließen, wurden alle Experimente, die EcoRII enthielten, ausschließlich im EcoRII-Reaktionspuffer durchgeführt [43]. Da für das kommerzielle Mval keine Angaben über die Proteinkonzentration verfügbar sind, haben wir durch vergleichende Analyse von Mval-Proteinbanden mit bekannter Proteinmenge aus SDS-Polyacrylamid Gelen nach Coomassie-Färbung die Proteinkonzentration von Mval visuell geschätzt.

2.7 Berechnungen der freien Energie mit FoldX

Für die FoldX Analyse wurde jede Aminosäure innerhalb der Domänenschnittstelle automatisch zu Alanin mutiert und die Änderung der „freien Energie“ berechnet. Um eine solche Analyse für unsere Fragestellung durchführen zu können, haben wir die N-terminalen (1-173) und C-terminalen Aminosäuren (174-402) als eigenständige Moleküle betrachtet (PDB Eintrag 1NA6) und die Domänenzuordnung manuell geändert. Die Berechnungen wurden schließlich mit FoldX Version 2.65 (<http://foldx.embl.de>) und dem „complex_alascan“ durchgeführt [26]. Die Abbildungen wurden mit der frei zugänglichen Software PyMOL Version 0.99rc6 (<http://www.pymol.org/>) erstellt.

2.8 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Die Messung der CD-Spektren der Proteine wurde mit dem „Applied Photophysics PiStar Kinetic Circular Dichroism Spectrometer“ im Institut für Biophysikalische Che-

mie an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Die Messungen wurden mit einer adaptiven Scan-Rate durchgeführt. Die Bandenbreite betrug dabei 5 nm. Durch die niedrige Proteinkonzentration der Proben (0,04 bis 0,1 mg ml⁻¹) wurde eine 3 mm dicke Küvette verwendet. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden jeweils fünf Messungen für jede Probe gemittelt und mit der Software K2D ausgewertet.

2.9 Limitierte Proteolyse von M.EcoRII

Bei der kinetischen Untersuchung der Proteolyse von M.EcoRII wurde in jedem der vier Ansätze 164 µg Protein (28 nmol) eingesetzt. Die Ansätze enthielten eine Endkonzentration von 100 mM Tris-HCl pH 7,6 sowie 5 mM S-Adenosyl-L-Homocysteine (AdoHcy). Die jeweiligen DNA-Substrate wurden in einem leichten Überschuss zu M.EcoRII (1:1,2) eingesetzt (30 nmol) (Tab. 2). Die Ansätze wurden vor der Trypsin-Zugabe für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3,48 µl einer frischen 0,1 µg/µl Trypsinlösung gestartet. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 37°C für den Zeitraum von acht Stunden. Aus dem 120 µl Ansatz wurden anschließend zu definierten Zeitpunkten jeweils 10 µl entnommen. Die Proteolysereaktion wurde mit 3X SDS Gelladepuffer [187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6 % (m/v) SDS; 30 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau, 120 mM DTT] gestoppt. Die proteolytischen Ansätze wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden mit Coomassie gefärbt. Für die massenspektroskopische Bestimmung der Fragmente wurden Rückstellproben der kinetischen Experimente verwendet. Die Experimente mit den Additiven AdoMet, AdoHcy und Sinefungin wurden in 20 µl Ansätzen durchgeführt und enthielten dabei 100 mM Tris-HCl pH 7,6 sowie entweder 3 mM AdoHcy, 3 mM AdoMet oder 3 mM Sinefungin. Bei diesen Experimenten wurden die verschiedenen DNA-Substrate in einen 1,6-fachen Überschuss zum Protein eingesetzt. Vor der Zugabe von Trypsin wurden die Ansätze für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Zugabe von Trypsin bei 37°C für drei Stunden inkubiert. Diese Ansätze wurden anschließend in 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und entweder mit Coomassie gefärbt oder für den spezifischen Antikörpernachweis auf PVDF-Membranen (ROTH) transferiert.

2.10 Western-Blot Experimente

Für den Western-Blot wurden die in 12%ige SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine mittels einer Semidry-Blotapparatur (Hofer, Semiphor) bei 1 mA/cm^2 auf eine PVDF-Membran übertragen und über Nacht in 5% Trockenmilch geblockt. Für den spezifischen Antikörpernachweis wurde ein Tetra-His Antikörper (Qiagen) in einem Verhältnis 1:500 in 5% Trockenmilch eingesetzt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1X PBS und 0,2 % (w/v) Tween gewaschen. Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde das ECL-Reagenz verwendet (Pierce). Die Aufnahme der Signale erfolgte mit einer CCD-Kamera bei 482 nm (Alpha Innotech Corporation).

2.11 Test der DNA-Methylierungsaktivität

Die Methylierungsreaktion wurde in 1X EcoRII-Reaktionspuffer in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ AdoMet in einem Gesamtvolumen von $20 \mu\text{l}$ durchgeführt. Der Ansatz enthielt außerdem $0,5\text{-}1,5 \text{ pmol}$ M.EcoRII sowie 150 ng pBR322 DNA ($0,32 \text{ pmol}$ EcoRII Erkennungsorte). Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37°C . Durch anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde M.EcoRII von der DNA getrennt. Die gereinigte DNA wurde in 1X EcoRII-Reaktionspuffer mit $0,8 \text{ pmol}$ EcoRII für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung der Spaltprodukte erfolgte in 1% Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung.

2.12 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die $20 \mu\text{l}$ Ansätze aus dem Methylierungstest auf $300 \mu\text{l}$ mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde $150 \mu\text{l}$ Phenol und $150 \mu\text{l}$ Chloroform gründlich vermischt und hinterher bei 14.000 rpm für drei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (Eppendorf Rotor F45-12-11). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 1 ml eiskaltem, absolutem Ethanol und $1 \mu\text{l}$ 20 mg/ml Glycogen versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20°C über Nacht. Die DNA wurde anschließend bei 14.000 rpm und 4°C für 45 Minuten pelletiert (Eppendorf Rotor F45-12-11). Die Überstände wurden verworfen und das Pellet mit $750 \mu\text{l}$ 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden erneut

für 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und die DNA-Pellets nach vollständiger Trocknung anschließend in Wasser aufgenommen.

2.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die DNA-Substrate für die Gel-Shift Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Hartmann Analytic) markiert. Für Details der Markierung verweise ich auf folgende Publikation [44]. DNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe der T4 DNA-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert und durch Gelfiltration mit G50-Säulen (Amersham Bioscience) gereinigt. Die DNA-Substrate wurden mit steigenden Mengen der jeweiligen Proteine inkubiert. Die Experimente mit M.EcoRII und den M.EcoRII-Mutantenzymen wurden jeweils in 10 μl Ansätzen mit 1X Puffer (7,5% Glycerol, 40 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM DTT, 1 mM EDTA) sowie in einigen Experimenten zusätzlich mit 1 mM AdoHcy durchgeführt (siehe jeweilige Abbildungslegende). Die Proben wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Gellauf wurde in einem 1X TRIS-Borat EDTA-Puffer (TBE Puffer) bei 30 mA und 8°C für 90 Minuten durchgeführt. Die Gele wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet (Amersham Biosciences). Die Bestimmung der DNA-Bindungsaffinität erfolgte dabei durch die Berechnung der proteingebundenen und der Gesamtradioaktivität in jedem einzelnen Ansatz mit der Software ImageQuant (Amersham Bioscience). Die scheinbare Dissoziationskonstante $K_{D(\text{app})}$ wurde als die Enzymkonzentration bestimmt, bei der 50 % der gesamten Radioaktivität proteingebunden sind [44].

Tabelle 3: Oligonukleotide, die für EMSA-Experimente verwendet wurden

Name der Oligonukleotide	Orientierung	Sequenz	Firma
M.EcoRII Promotor 38	vorwärts	5'-AATCTGGGTCAAATGAGTGATACAGTTTCACCCATAAG	BioTeZ
M.EcoRII Promotor 38	rückwärts	5'-CTTATGGGTGAAACTGTATCACTCATTTGACCCAGATT	BioTeZ
Unspezifische DNA 38	vorwärts	5'-ATATAGCAGAGATGTGATAAGTCATCTGACTATCGCAC	Sigma Aldrich
Unspezifische DNA 38	rückwärts	5'-GTGCGATAGTCAGATGACTTATCACATCTCTGCTATAT	Sigma Aldrich
M.EcoRII Promotor 15	vorwärts	5'-CATTTGACCCAGATT	Sigma Aldrich
M.EcoRII Promotor 15	rückwärts	5'-AATCTGGGTCAAATG	Sigma Aldrich
Erkennungssequenz 13	vorwärts	5'-CGATCCAGGTAGC	BioTeZ
Erkennungssequenz 13	rückwärts	5'-GCTACCTGGATCG	BioTeZ
PM40 30	vorwärts	5'-CGTAACGAATATCCAGGGTTACGACGTCGA	
PM41 30	rückwärts	5'-TCGACGTCGTAACCCCTGGATATTCGTTACG	

2.14 Präparation der proteolytischen M.EcoRII-Fragmente für die massenspektrometrische Analyse

Die Aufarbeitung und die massenspektrometrische Analyse der proteolytischen Peptide erfolgten am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin. Die individuellen Banden (Abb. 27 B) wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in etwa 1 cm³ Würfel zerkleinert. Die Stücke wurden anschließend mit 1 ml Acetonitril / 50 mM NHB₄BHCOB₃B (50 : 50) gewaschen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Überstände verworfen. Diese Waschschriffe wurden drei Mal wiederholt, bis die Gelstückchen vollständig entfärbt waren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Acetonitril und eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das überschüssige Acetonitril entnommen und die Gelstückchen wurden vollständig getrocknet. Die Proben wurden anschließend in einem Eisbad mit 10-20 µl (12,5 ng/ml) Trypsin für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 50 mM Ammoniumbikarbonat wurden die Proben für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Nach der Zugabe von 50 µl 5% Ameisensäure in 60% Acetonitril und einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der Überstand entnommen und mit dem Überstand aus dem vorherigen Schritt vermischt. Diese Prozedur wurde zwei Mal wiederholt, danach wurden die Proben vollständig getrocknet und in 30 µl 0,5% Ameisensäure resuspendiert. Die Messung wurden an einer 1100 nano-LC Apparatur (Agilent), ausgestattet mit Zorbax 300SB-C18 3,5 µm, 150 mm x 75 µm, Zorbax 300 SB-C18 3,5 µm, 0,3 x 5 mm Säule, durch die Injektion von 10 µl der Probe durchgeführt. Die Auftrennung wurde mittels eines Gradienten aus Wasser und Acetonitril und der maximalen Durchflussrate von 0,25 µl/Minute durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit dem Gerät Qstar XL (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.15 Kristallisation der Restriktionsendonuklease EcoRII

Die Kristallisation von EcoRII wurde bei 18°C mit der „Dampfdiffusionsmethode“ in sitzenden Tropfen durchgeführt. Die besten Kristalle wuchsen innerhalb von drei Tagen in Kristallisationstropfen mit 8,2 µg/µl (90 pmol/µl) EcoRII. Der Reservoir-Puffer bestand dabei aus 5% Tacsimate pH 7,0; 100 mM HEPES pH 7,5 und 10% Polyethylenglykol (PEG) 5000 und wurde 1:1 mit der Probe vermischt. Die Daten der EcoRII-WT Kristalle wurden an der Synchrotron Beamline BL 14.2 in der Einrichtung

der Freien Universität Berlin, dem BESSY, gemessen. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe P21 mit zwei Monomeren in einer asymmetrischen Einheit. Die EcoRII-Struktur wurde mit der „Molekularen Ersatzes“-Methode [82,83] und der Mutantenstruktur R88A (PDB Eintrag 1NA6) sowie der Software „Phaser“ gelöst [84]. Für die korrekte Lösung der Struktur wurde die Strukturvorlage (PDB Eintrag 1NA6) in mehrere Einzeldomänen zerteilt und mit einer „multi-copy“ Suche berechnet. Die vorläufigen Ergebnisse der Verfeinerung zeigen Rwork = 20% und Rfree = 25%.

2.16 Kristallisation der EcoRII-Methyltransferase mit hemi-methylierter DNA

Die Ansätze enthielten jeweils 7,5 µg/µl Protein (130 pmol/µl), 3,5 mM AdoHcy und hemimethylierte DNA (Tab. 4), in einem Verhältnis Protein zu DNA von 1 : 1,2. Die Proben wurden vor dem Ansetzen der Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kristalle vom M.EcoRII-Komplex wuchsen mit der „vapor diffusion“ Methode innerhalb von drei Tagen bei 18°C mit 2% 2-Propanol, 20% PEG 4000 und 100 mM Natriumcitrat als Reservoir-Puffer. Die Probe wurde dabei im Verhältnis von 1:1 mit dem Reservoir-Puffer vermischt. Die Daten der M.EcoRII-Kristalle wurden an der Synchrotron Beamline BL 14.2 in der Einrichtung der Freien Universität Berlin, dem BESSY, gemessen.

Tabelle 4: Oligonukleotide, die für Kristallisationsexperimente verwendet wurden

Kristallisationsoligonukleotide	Orientierung	Sequenz	Firma
M.EcoRII Promotor	vorwärts	5'-AATCTGGGTCAAATGAGTGATACAGTTTCACCCATAAG	BioTeZ
M.EcoRII Promotor	rückwärts	5'-CTTATGGGTGAAACTGTATCACTCATTGACCCAGATT	BioTeZ
Erkennungssequenz	vorwärts	5'-CGATCCAGGTAGC	BioTeZ
Erkennungssequenz	rückwärts	5'-GCTACCTGGATCG	BioTeZ
Erkennungssequenz	vorwärts	5'-CGATC[5-methyl Cytosine]AGGTAGC	Sigma Aldrich

2.17 Herstellung des Computermodells von EcoRII mit DNA

Zur Herstellung des EcoRII-Modells im katalytisch aktiven Zustand wurde die neue EcoRII-WT Struktur mit der Ko-Kristall Struktur von Ecl18kl (PDB Eintrag 2FQZ) überlagert. Für die Modellierung wurde die N-terminale EcoRII-Domäne aus der Struktur entfernt. Zur Berechnung des Modells wurde jeweils ein Monomer von EcoRII mit der Dimerstruktur von Ecl18kl überlagert und mit der Software „Deep-View“ Version 4.01 optimiert [85]. Zur Herstellung des EcoRII-Modells mit DNA in der katalytisch inaktiven Konformation wurde unsere EcoRII-WT Struktur und die Ko-

Kristallstruktur der N-terminalen EcoRII-Domäne mit gebundener DNA (PDB Eintrag 3HQF) verwendet. Die Ko-Kristallstruktur wurde mit Hilfe von „DeepView“ in die EcoRII-Dimerstruktur modelliert und optimiert. Für die Herstellung der EcoRII-Mg²⁺ Modelle wurden die NgoMIV- (PDB Eintrag 1FIU) und unsere EcoRII-WT Struktur verwendet. Die beiden Strukturen wurden mit Hilfe von „DeepView“ überlagert und optimiert. Für alle Überlagerungen wurden jeweils nur die C- α -Atome herangezogen. Die Entfernungsmessungen und Abbildungen wurden mit der Software PyMOL 0.99rc6 durchgeführt (www.pymol.org).

2.18 Berechnung der strukturellen Standardabweichung zwischen der neuen EcoRII- ,R88A- und Ko-Kristallstruktur

Die Berechnung der strukturellen Standardabweichung „root mean square deviation“ (RMS) wurde durch die Überlagerung der ausgewählten Bereiche mit der Software „DeepView“ Version 4.01 durchgeführt [85]. Für die Überlagerung wurden jeweils nur die C- α -Atome herangezogen und die Standardabweichung zwischen den Bereichen mit „DeepView“ berechnet.

2.19 Sequenzvergleich

Der Sequenzvergleich zwischen M.EcoRII und anderen DNA-MTasen wurde mit ClustalW2 durchgeführt [86]. Dabei wurden die in der NCBI-Datenbank hinterlegten FASTA Proteinsequenzen der Methyltransferasen mit der FASTA Sequenz unserer klonierten EcoRII-Methyltransferase verglichen.

2.20 Strukturabbildungen

Für die Erstellung der farbigen 3D-Strukturabbildungen wurde ausschließlich die Software PyMOL 0.99rc6 verwendet. Dabei wurden die Abbildungen mindestens in einer 1200X1200 dpi Auflösung erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des molekularen Mechanismus der Autoinhibition von EcoRII

Die Zugabe von EcoRII-N *in trans* zeigte einen starken inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von EcoRII-C

Basierend auf der Analyse der EcoRII-Kristallstruktur vermuteten wir, dass die katalytisch inaktive N-terminale Domäne mit der katalytisch aktiven C-Domäne interagiert und wie ein Repressor das katalytische Zentrum hemmt [48]. Um unsere Vermutung zu überprüfen, führten wir Titrationsexperimente durch, bei denen der Einfluss von EcoRII-N *in trans* auf die Spaltaktivität von EcoRII-C untersucht wurde. Wir inkubierten HindIII-linearisierte pBR322 DNA mit einer konstanten Menge EcoRII-C und steigenden Konzentrationen von EcoRII-N (Abb. 4A). Wir konnten beobachten, dass die Erhöhung der EcoRII-N Konzentration zu einer Verringerung der EcoRII-C Spaltaktivität führt. Der inhibitorische Effekt von EcoRII-N auf die EcoRII-C Spaltaktivität wurde bereits bei einem äquimolaren Verhältnis von EcoRII-N und EcoRII-C sichtbar. Eine starke Inhibition der Spaltaktivität wurde bei einem molaren Verhältnis von 1:20 (EcoRII-C : EcoRII-N) beobachtet. Eine vollständige Hemmung der DNA-Spaltung durch EcoRII-N wurde bei einem molaren Verhältnis von 1:50 erreicht. Um zu beweisen, dass der inhibitorische Effekt von EcoRII-N nicht durch eine kompetitive Bindung

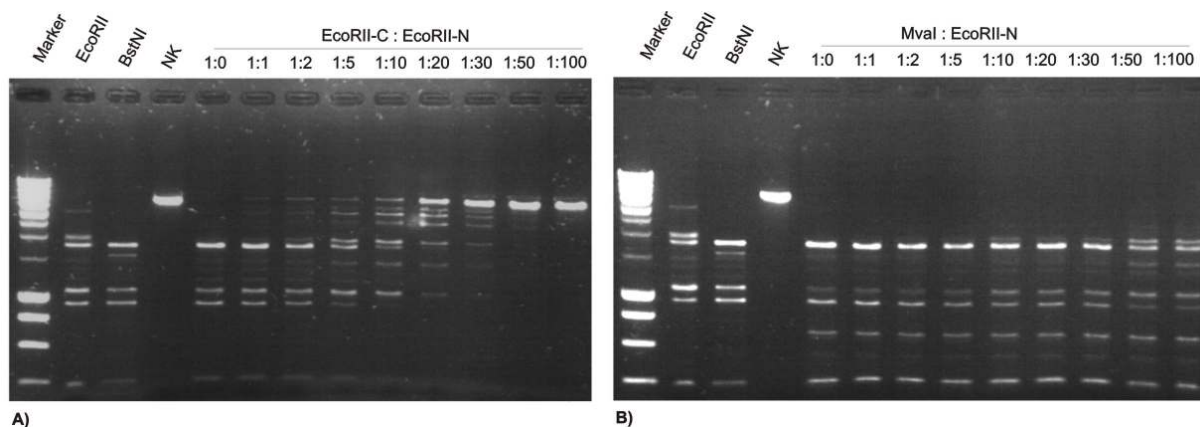


Abbildung 4: Inhibition der DNA-Spaltung durch EcoRII-C nach Zugabe von EcoRII-N *in trans*. 150 ng pBR322 DNA (0,32 pmol EcoRII Erkennungsorte) wurden mit 0,32 pmol EcoRII-C (A) bzw. 0,32 pmol MvaI (B) inkubiert. In (A) und (B) wurden jeweils molare Überschüsse von EcoRII-N über EcoRII-C bzw. MvaI, im Verhältnis 1:1 bis 1:100 hinzugegeben. Die EcoRII-Ansätze wurden bei 37°C, die BstNI Ansätze bei 60°C inkubiert. Die Bezeichnung NK steht für Negativkontrolle und enthält nur pR322 DNA. Der verwendete DNA-Marker war der „Smart ladder“ (Eurogentec).

von EcoRII-N an den DNA-Erkennungsort hervorgerufen wurde, haben wir Mval, ein EcoRII-Isoschizomer, als Kontrolle verwendet [87]. Die Titrationsexperimente mit Mval zeigten, dass EcoRII-N keinen Effekt auf die DNA-Spaltaktivität von Mval hat (Abb. 4B). Die schrittweise Erhöhung von 1:1 bis 1:20 hatte keinerlei Einfluss auf die Spaltung durch Mval. Bei einem molaren Verhältnis von 1:50 und 1:100 war lediglich ein schwacher inhibitorischer Effekt sichtbar.

Aus unseren Ergebnissen können wir schlussfolgern, dass EcoRII-N einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Spaltung durch EcoRII-C hat. Dieser Effekt beruht offenbar auf der Interaktion zwischen den beiden Domänen. Eine kovalente Kopplung beider Domänen scheint dabei nicht notwendig zu sein.

Substitutionen einzelner Aminosäuren in den vorhergesagten Interdomänen-Kontaktstellen führten zu einer Abschwächung der Autoinhibition

Um die wichtigsten Aminosäuren der Interdomänen-Kontaktstelle zu bestimmen, berücksichtigten wir Aminosäuren, die in der Kontaktregion der Domänen stabilisierende Wasserstoffbrücken ausbilden sollten [48]. Zusätzlich analysierten wir die EcoRII 3D-Kristallstruktur mit der Software FoldX, um die wichtigsten Aminosäuren der Interdomänen-Kontaktstelle vorherzusagen. FoldX ist eine bioinformatische Software, die entwickelt wurde, um eine schnelle Evaluierung der Effekte von Mutationen in Proteinen durchzuführen. Dabei ermöglicht die Software eine Vorhersage über die Stabilität von Proteinen sowie Proteinkomplexen. FoldX wurde durch experimentelle Untersuchungen von mehr als 1000 Punktmutationen kalibriert, wobei Änderungen der „Freien Energie“ bestimmt wurden [88]. In unserer Anwendung haben wir die Software für die Analyse der Interdomäneninteraktion in EcoRII verwendet.

Die EcoRII-Struktur zeigt das Enzym als Homodimer, das von den Monomeren A und B gebildet wird [48]. Die Untersuchung der beiden Monomere wies Unterschiede zwischen dem Monomer A und B auf. Dieses Phänomen wird durch beide Analysemethoden gleichermaßen beschrieben (Tab. 5). Aus diesem Grunde wählten wir für die Substitutionsmutationen nur Aminosäuren aus, die in beiden Monomeren entweder durch die Kristallstrukturanalyse oder durch FoldX-Berechnung als Kontaktstellen vorhergesagt wurden. Die wichtigsten Interaktionen wurden dabei durch Ala27/Glu351, Glu112/Ser354, Glu145/Arg330 und Ser173/Arg262 gebildet (Abb. 5).

Tabelle 5: Vergleichende Untersuchung der Inter-Domänen Kontakte mittels Kristallstruktur und FoldX-Berechnungen

Inter-Domänen Wasserstoffbrücken aus Kristallstruktur ^{a)}			Vorhersage durch FoldX ^{b)}	
N-Domäne	C-Domäne	Wasserstoffbrücken Länge in [Å]	Inter-Domänen Interaktion in $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	
Monomer A			Monomer A	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
Arg24	Thr326	3,3	Glu145 zu Ala	224,223
Ser26	Glu351	2,93	Gol149 zu Ala	132,054
Ala27	Glu351	3,25	Pro157 zu Ala	106,236
Pro111	Ser354	3,09	Gln175 zu Ala	133,009
Glu112	Gln357	3,09	Arg262 zu Ala	222,646
Glu145	Arg330	2,8	Lys263 zu Ala	182,097
Thr150	Lys263	2,68	Arg330 zu Ala	20,732
Ala151	Lys263	3,06	Gln350 zu Ala	100,204
Monomer B			Monomer B	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
Ala27	Glu351	2,94	Glu145 zu Ala	264,875
Glu112	Ser354	2,86	Glu149 zu Ala	117,803
Thr114	Gln357	3,17	Pro157 zu Ala	102,383
Glu145	Arg330	2,57	Leu172 zu Ala	208,699
Ala151	Lys263	3,06	Ser173 zu Ala	250,682
			Arg330 zu Ala	262,872

^{a)} Wasserstoffbrücken wurden mit einer maximalen Länge von 3.3 Å und einer minimalen Entfernung von 1.2 Å vorhergesagt (PDB Eintrag 1NA6) [48]. ^{b)} Liste der Aminosäuren, die wie durch FoldX 2.65 vorhergesagt, an der Ausbildung der Inter-Domänen Kontaktstelle zwischen der N- und C-terminalen Domäne beteiligt sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Die Änderung von ($\Delta\Delta G$) wurde durch *in silico* Mutation aller Positionen zu Alanin durchgeführt [88].

Um unsere Vermutung zu prüfen, welche der in der Interdomänen-Kontaktstelle vorhergesagten Aminosäuren wichtig für den Autoinhibitionsmechanismus sind, haben wir die Aminosäuren Glu145, Ser173, Glu351 und Ser354 durch Alanine substituiert und die Spaltung von T3 Phagen-DNA durch diese Mutantenzymen untersucht. Wir verwendeten T3-DNA, da EcoRII-WT dieses Substrat nicht spalten kann, wohingegen das trunkierte, dereprimierte Enzym EcoRII-C T3-DNA sehr effizient spaltet. Abbildung 6 zeigt die vollständige Spaltung von T3-DNA durch EcoRII-C und die Positivkontrolle BstNI. Im Gegensatz dazu zeigte EcoRII-WT wie erwartet keine Spaltaktivität. Alle unsere Mutantenzymen mit Ausnahme von S354A zeigten eine partielle T3-DNA Spaltung. Die Herstellung von Doppelmutanten (E145A/S173A, E145A/E351A, E145A/S354A, S173A/E351A, S173A/S354A) führte zu keiner zusätzlichen Dereprimierung von EcoRII (Daten nicht gezeigt).

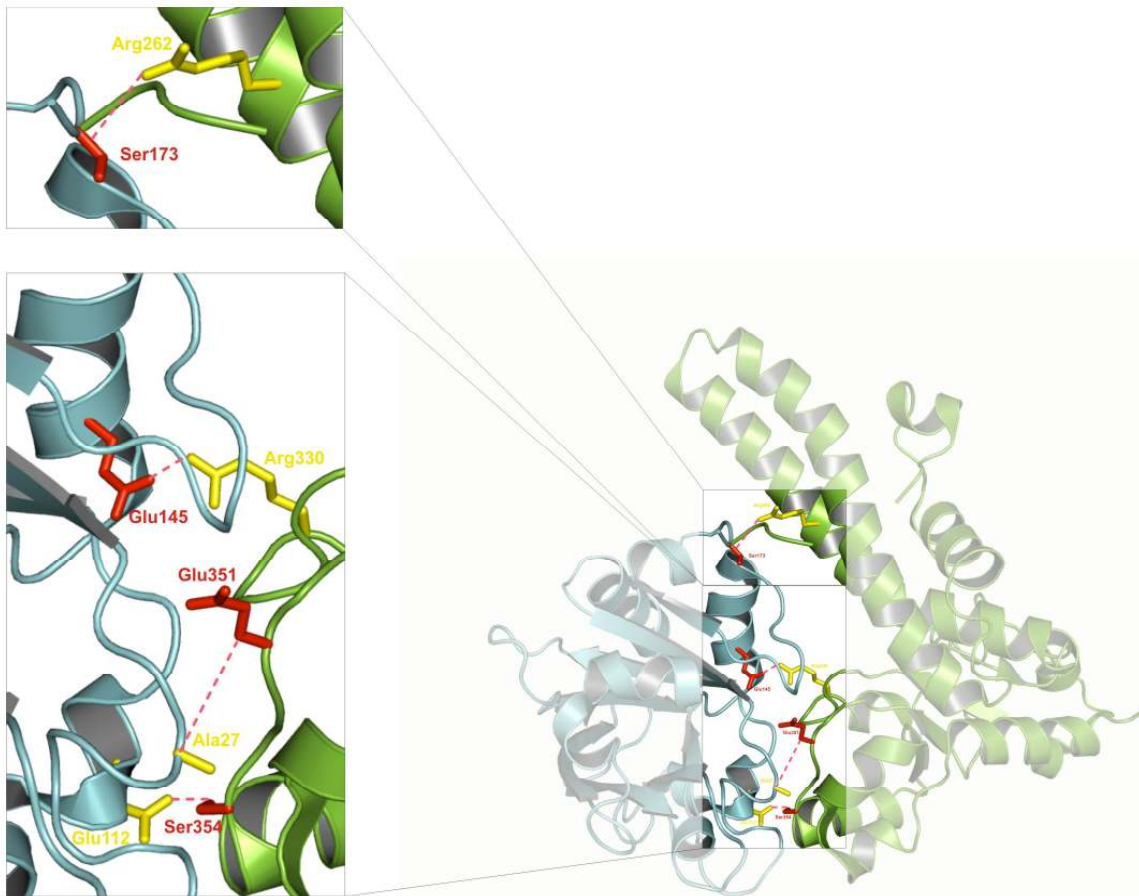


Abbildung 5: Darstellung der Aminosäuren aus der 3D-Proteinstruktur von EcoRII (PDB Eintrag 1NA6), die putativ an der Ausbildung der Interdomänen-Kontaktstellen zwischen der N- und C-terminalen Domäne beteiligt sind. Die N-terminale Domäne ist blau, die C-terminale Domäne grün dargestellt, die mutierten Positionen Ser173, Glu145, Glu351 und Ser354 rot, ihre Interaktionspartner Ala27, Glu112, Arg262 und Arg330 gelb. Die Wasserstoffbrücken sind jeweils durch gestrichelte Linien dargestellt [48].

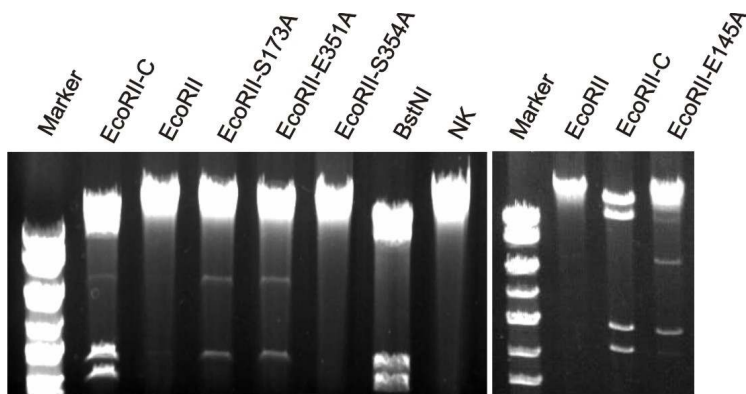


Abbildung 6: Substitutionen einzelner Aminosäuren innerhalb der putativen Interdomänen-Kontaktstellen zwischen der N- und C-Domäne. Die Ansätze enthielten 300 ng T3 Phagen-DNA (31,1 fmol EcoRII Erkennungsorte) und wurden mit EcoRII-C, EcoRII, BstNI sowie den EcoRII-Mutantenzymen S173A, E351A, S354A und E145A gespalten. Um eine vollständige Spaltung zu erreichen, wurde ein 50-facher molarer Überschuss von EcoRII und den EcoRII-Mutantenzymen über die Anzahl der Erkennungsorte der DNA eingesetzt (1,76 pmol). NK zeigt die Negativkontrolle, die nur T3 Phagen-DNA enthielt. Alle EcoRII-Ansätze wurden bei 37°C, die Ansätze mit BstNI bei 60°C inkubiert. Der verwendete DNA-Marker war der „Smart ladder“ (Eurogentec).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Substitution der als Interdomänen-Kontaktstellen vorhergesagten Aminosäuren Glu145, Ser173 und Glu351 durch Alanine zu einer partiellen Dereprimierung des Enzyms führt.

Synthetische Peptide zeigten *in trans* einen starken inhibitorischen Effekt auf die durch EcoRII-C vermittelte DNA-Spaltung

Der Versuch durch Substitution einzelner Aminosäuren den Autoinhibitionsmechanismus vollständig aufzuheben war nicht erfolgreich. Deshalb entschlossen wir uns 30 Aminosäuren lange synthetische Peptide zu verwenden, die Aminosäure-Bereichen der N-terminalen Domäne entsprechen, um EcoRII-C zu inhibieren. Um potenzielle autoinhibitorische Elemente zu finden, haben wir die gesamte N-terminale Domäne nach Sekundärstrukturmotiven durchsucht, die mit der C-terminalen Domäne interagieren (Tab. 5). Peptid 1 beinhaltet die Aminosäuren 4-33 und die Sekundärstruktur motive [α -Helix (H1), β -Strang (B1) und α -Helix (H2)] (Abb. 7). Peptid 2 umfasst die Aminosäuren 144-173 und enthält die Sekundärstruktur motive [α -Helix (H6), β -Strang (B8) und α -Helix (H7)] (Abb. 7). Beide Regionen befinden sich in der Interdomänen-Kontaktstelle zwischen der N- und C-terminalen Domäne, wo sie stabilisierende Wasserstoffbrücken ausbilden [48]. Die Peptidsequenzen wurden mit der Software „globplot“ analysiert, welche über EMBL erreichbar ist (<http://globplot.embl.de/>). Diese Analyse ermöglicht eine Vorhersage von geordneten und ungeordneten Sekundärstrukturen. Die Ergebnisse der Analyse sagten eine geordnete Struktur der synthetischen Peptide voraus, welche den Sekundärstrukturen der EcoRII-Kristallstruktur entsprach (Daten nicht gezeigt). Um herauszufinden, ob die synthetischen Peptide in der Lage sind, die DNA-Spaltaktivität von EcoRII-C zu inhibieren, haben wir Spaltexperimente mit Peptiden *in trans* durchgeführt. Um eine unspezifische Wirkung der Peptide ausschließen zu können, benutzten wir für Kontrollexperimente ein randomisiertes Peptid (Peptid 3) und Mval, ein EcoRII-Isoschizomer. Plasmid pBR322-DNA wurde mit EcoRII-C bzw. Mval in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Peptid 1, 2 und 3 inkubiert. Peptid 1 begann die DNA-Spaltung durch EcoRII-C bereits bei einem 10-fachenmolaren Überschuss zu hemmen (Abb. 8A). Die Verwendung von molaren Überschüssen von 1:25 bis 1:50 hatte eine starke inhibitorische Wirkung und führte zum vollständigen Verlust der Spaltaktivität von EcoRII-C bei einem Verhältnis von 1:50.

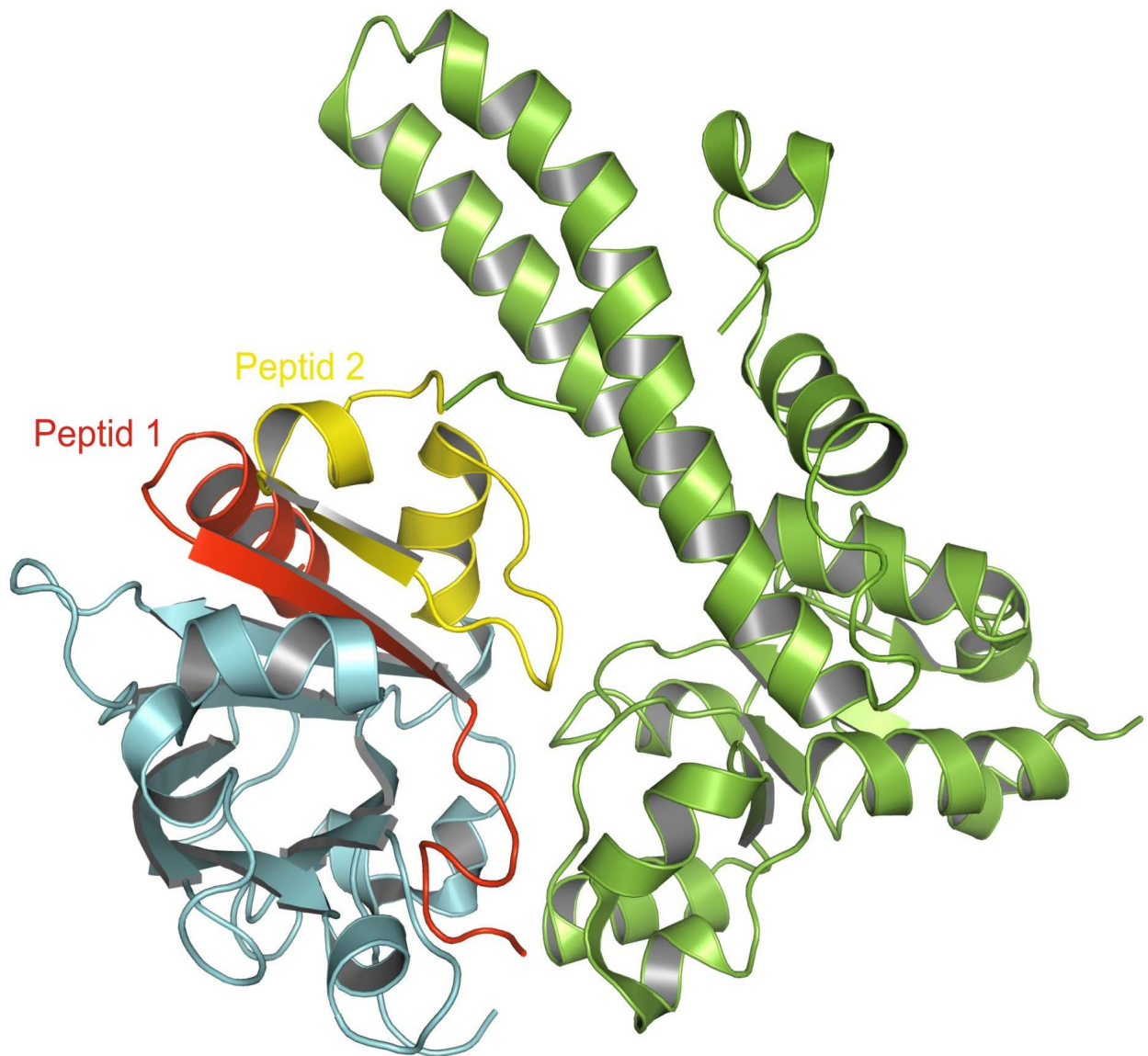


Abbildung 7: Lokalisation der Peptide 1 und 2 in der 3D-Proteinstruktur von EcoRII. Die N-terminale Domäne ist blau, die C-terminale Domäne grün dargestellt. Das Peptid 1 ist rot, das Peptid 2 gelb gefärbt (PDB Eintrag 1NA6).

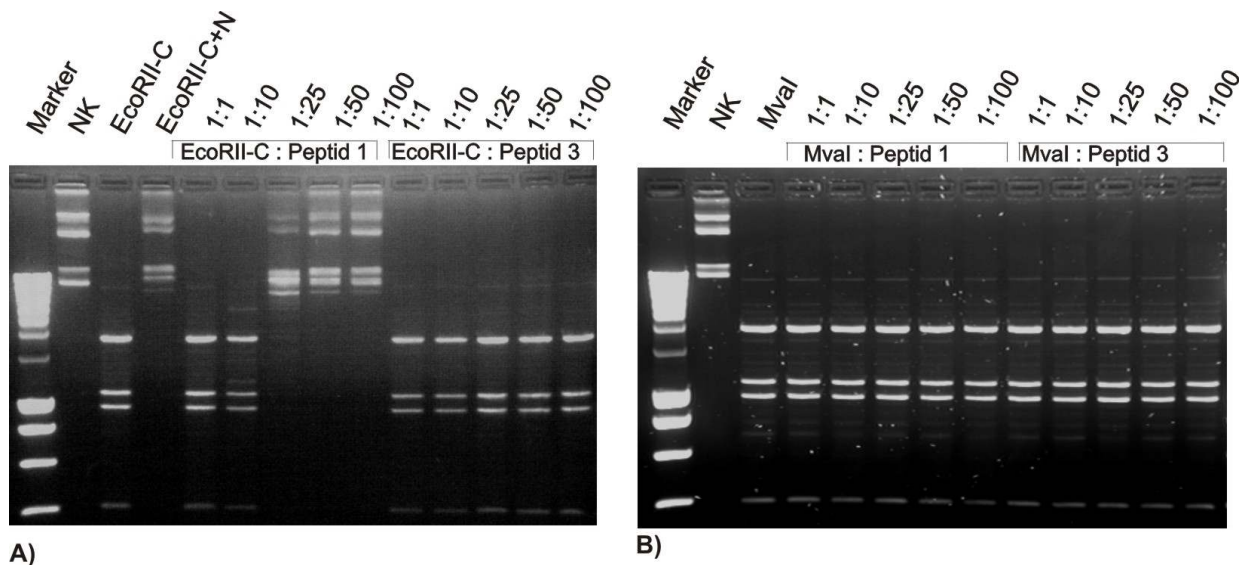


Abbildung 8: Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von synthetischen Peptiden aus der inhibitorischen Domäne (EcoRII-N) auf die DNA-Spaltung durch EcoRII-C und MvaI. A) Die Experimente wurden mit Peptid 1, 2 und dem Kontrollpeptid 3 durchgeführt. EcoRII-C wurde dabei in einem molaren Verhältnis von 2:1 zu den DNA-Erkennungsorten eingesetzt. Die synthetischen Peptide wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis zu einem 100-fachen molaren Überschuss über das Enzym eingesetzt. B) Für die Experimente mit MvaI wurden 0.07 pmol pro Ansatz für eine optimale Spaltung verwendet. Alle Ansätze enthielten jeweils 150 ng pBR322 DNA. NK bezeichnet die Negativkontrolle, die nur die DNA enthält. Der Ansatz mit EcoRII-C+N (Inhibitionskontrolle) enthielt EcoRII-C mit 20-fachem molarem Überschuss an EcoRII-N. Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Der verwendete DNA-Marker war der „Smart ladder“ (Eurogentec).

Die Inhibition von EcoRII-C durch Peptid 1, bei einem Verhältnis von 1:50 war mit der durch EcoRII-N hervorgerufenen Inhibition vergleichbar (Abb. 4A). Peptid 3 hatte bei keiner verwendeten Konzentration Wirkung auf EcoRII-C. Interessanterweise hatte Peptid 2 weder auf EcoRII-C noch auf MvaI eine Wirkung. MvaI zeigte sich bei keinem der von uns verwendeten Peptide in der Aktivität inhibiert (Abb. 8B). Experimente, bei denen Peptid 1 und 2 gleichzeitig zugegeben wurden, hatten keinen synergistischen Effekt auf EcoRII-C (Daten nicht gezeigt). Um die Spezifität von Peptid 1 zu überprüfen, benutzten wir ebenfalls MvaI als Kontrolle. Es zeigte sich dabei deutlich, dass Peptid 1 keinen Effekt auf die durch MvaI vermittelte DNA-Spaltung ausübt. Das Peptid 3 hatte erwartungsgemäß ebenfalls keinen Effekt auf MvaI.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass synthetische Peptide in der Lage sind, Sekundärstrukturen auszubilden. Peptid 1 imitiert offensichtlich das inhibitorische Motiv von EcoRII-N und führt damit zur vollständigen Hemmung von EcoRII-C.

Identifizierung der minimalen inhibitorischen Region aus Peptid 1 zeigte, dass β -Strang B1 und α -Helix H2 für die Autoinhibition verantwortlich sind

Um die für die Autoinhibition notwendige minimale Region herauszufinden, haben wir EcoRII-Deletionsmutanten konstruiert, denen jeweils eines der Sekundärstrukturelemente aus Peptid 1, (H1, B1 oder H2) fehlte (Abb. 9). T3 DNA-Spaltexperimente zeigten eindeutig, dass die Deletionsmutanten EcoRII- Δ B1 und EcoRII- Δ H2 einen vollständigen Verlust der Autoinhibition aufweisen. Die normalerweise durch den N-Terminus vermittelte Autoinhibition war bei diesen Deletionsmutanten vollständig aufgehoben, was sich durch eine mit EcoRII-C und BstNI vergleichbar effiziente T3-DNA Spaltung äußerte. Die Deletionsmutante- Δ H1 zeigte dagegen nur eine partielle T3-DNA Spaltung und verfügte über eine nur teilweise aufgehobene Autoinhibition (Abb. 10 A, B). Um ausschließen zu können, dass die Deletion von kurzen Bereichen innerhalb von EcoRII zu großen strukturellen Störungen führt, haben wir mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie sowohl den EcoRII-Wildtyp als auch die Deletionsmutanten EcoRII- Δ H2 und EcoRII- Δ B1 untersucht (Abb. 11). Der Vergleich der CD-Spektren zeigt, dass sich die Mutantenzymen vom Wildtyp nur sehr geringfügig unterscheiden. Die Werte der Dekonvolution zeigen bei allen gemessenen Enzymen nahezu die gleichen Ergebnisse der Sekundärstrukturverteilung. Dabei fielen 26% auf α -Helices, 17% β -Stränge und 57% auf andere Sekundärstrukturen. Diese Ergebnisse sind mit früheren Circular dichroismus-Spektroskopien von EcoRII Untersuchungen vergleichbar [44,89].

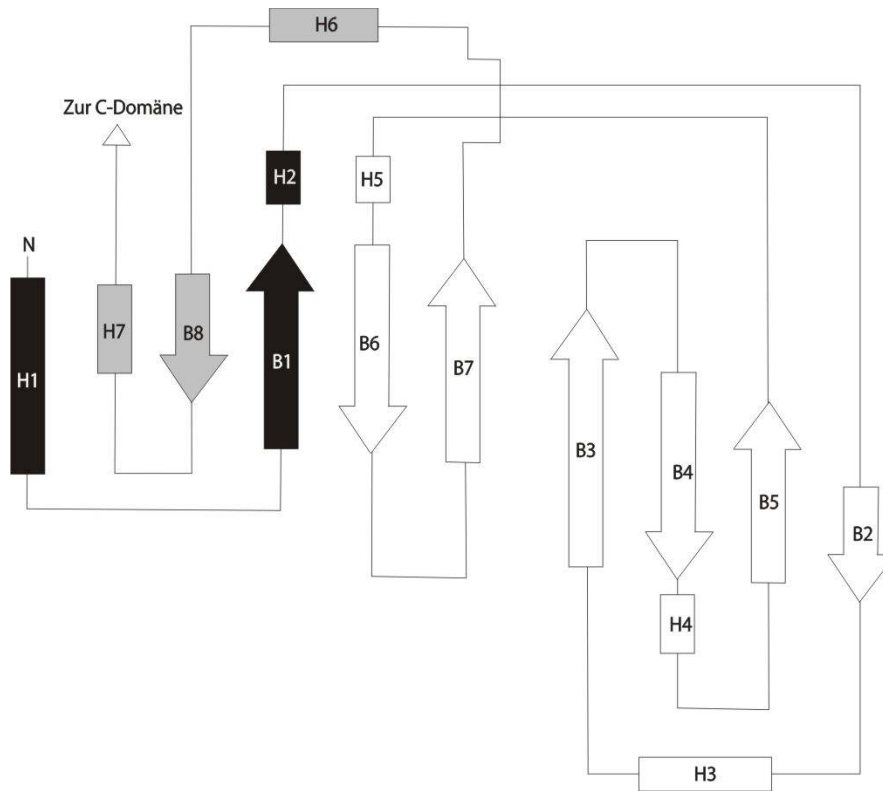
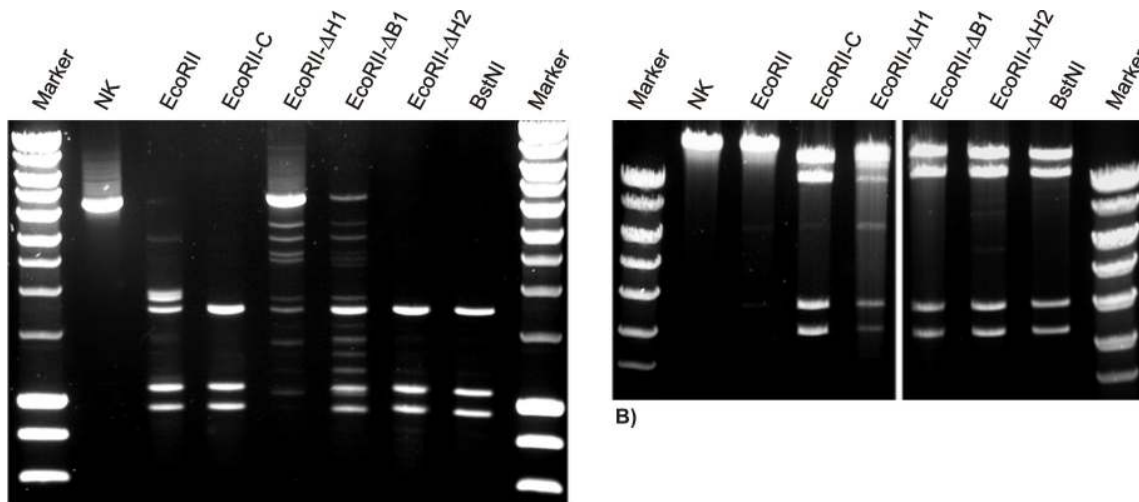


Abbildung 9: Übersichtsdarstellung der in EcoRII-N lokalisierten Peptide 1 und 2. Rechtecke repräsentieren dabei die α -Helices, Pfeile die β -Faltblätter. Die Sekundärstrukturen aus dem Peptid 1, (H1, B1 und H2) sind schwarz, die Sekundärstrukturen aus Peptid 2 (H6, B8 und H7) grau dargestellt.



A)

B)

Abbildung 10: EcoRII-Mutantenenzyme, denen die Sekundärstrukturen β -Strang B1, α -Helix H1 und α -Helix H2 fehlen, zeigen vollständige Aufhebung der Autoinhibition. Für die Ansätze wurden 150 ng pBR322 DNA (A) und 400 ng T3 Phagen-DNA (B) verwendet. 150 ng pBR322-DNA entsprechen 0,32 pmol EcoRII Erkennungsorten, 400 ng T3-DNA entsprechen 46,8 fmol EcoRII Erkennungsorten. Für die T3-DNA Spaltung durch EcoRII, EcoRII-C und EcoRII- Δ H1 wurde ein 50-facher Überschuss an Enzym über Erkennungsorte eingesetzt. Für EcoRII- Δ H2 und EcoRII- Δ B1 reichte ein 20-facher molarer Überschuss zur vollständigen Spaltung. In den Experimenten mit pBR322 DNA wurde ein molares Verhältnis von 2:1 von Enzym zu Erkennungsorten eingesetzt. NK bezeichnet dabei die Negativkontrolle, die nur die T3 Phagen-DNA enthält. Die Ansätze mit EcoRII und den Mutantenenzymen wurden bei 37°C, die Ansätze mit BstNI bei 60°C inkubiert. Der verwendete DNA-Marker war der „Smart ladder“ (Eurogentec).

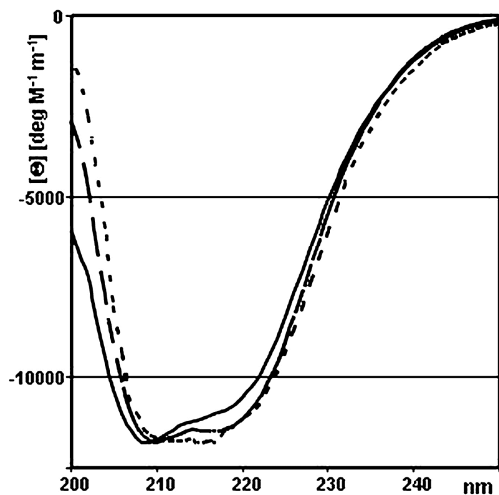


Abbildung 11: Circulardichroismus-Spektren von EcoRII, EcoRII- Δ B1 sowie EcoRII- Δ H2. EcoRII ist durch eine durchgezogene Linie, EcoRII- Δ B1 durch eine gepunktete Linie und EcoRII- Δ H2 durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

Unsere Ergebnisse lassen schlussfolgern, das β -Strang B1 (18YFVYIKR24) und α -Helix H2 (26SANDT30) essentielle Sekundärstrukturen darstellen, die die Autoinhibition vermitteln. Die Deletion einer dieser beiden Sekundärstrukturen führt zu einem Verlust der Reprimierung und damit zu einer Aktivierung des EcoRII Enzyms.

3.2 Die Röntgenstruktur des nativen EcoRII-Enzyms bei einer Auflösung von 1.9 Å lieferte neue Erkenntnisse über die DNA- und Mg²⁺-Bindung

Vergleich der neuen EcoRII-WT mit der R88A-Mutantenstruktur zeigt Unterschiede in der Dimerkonformation

Da für EcoRII nur die Struktur eines Mutantenzym bekannt ist, haben wir versucht eine hoch aufgelöste Struktur des WT-Enzyms herzustellen. Die Kristallisation von EcoRII-WT verlief mit Hilfe der "Dampfdiffusionsmethode" erfolgreich. Die besten Kristalle wuchsen bei 18°C innerhalb von drei Tagen und wurden im Synchrotron vermessen und analysiert (Abb. 12).

Die Kristalle diffraktierten bis zu einer Auflösung von 1,9 Å (Tab. 6). Die Lösung der Struktur erwies sich als schwierig, da die native EcoRII-Struktur nicht mit der gesamten Struktur des Mutantenzym (PDB Eintrag 1NA6) gelöst werden konnte. Abbildung 13 zeigt die Überlagerung der R88A- und der EcoRII-WT Struktur und verdeutlicht die Unterschiede zwischen den beiden Strukturen. Eine geeignete Lösung der EcoRII-WT Struktur konnte durch Verwendung von einzelnen Domänenfragmenten des Mutantenzym mit der Methode des „Molekularen Ersatzes“ gelöst werden. Die Berechnung der Strukturunterschiede mittels „root mean square deviation“ (RMS) beschreibt die Unterschiede zwischen den beiden Strukturen (Tab. 7). Die Berechnung der Strukturunterschiede beider Dimerstrukturen zeigte eine Abweichung zwischen den Monomeren A von 3,75 Å und 3,92 Å für Monomer B (Tab. 7 A).

Tabelle 6: Daten der Kristallmessung und Ergebnisse der Strukturlösung

Raumgruppe	P21
Auflösung (Å)	50.0 - 1.90 (1.94-1.89)
Gitterkonstanten	a = 56 Å, b =130 Å, c = 60 Å, a = g = 90°, b = 91.6°
Rmerge	0.04 (0.58)
I / σ [I]	20.8 (2.3)
Vollständigkeit (%)	99.7 (99.9)
Redundanz	3.8 (3.8)
Vorläufige Auflösungsgrenzen (Å)	50 - 1.9
Rwork / Rfree (%)	20.1 / 25.0
Anzahl benutzter Reflexe	64.693
r.m.s.-Abweichung (r.m.s.-,root.mean.square“) für die Standardgeometrie SG der Bindungsdistanz [Å] und der Bindungswinkel [°]	0.010 Å / 1.30°
Ramachandran-Statistik - Reste in am meist bevorzugten/erlaubten/verbotenen Regionen [%]	93.2 / 4.2 / 2.6

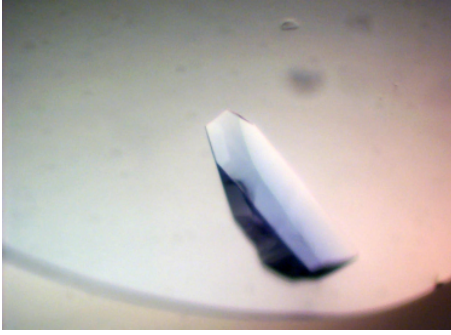


Abbildung 12: EcoRII-WT Kristall im Kristallisationstropfen

Die größte Abweichung zwischen den beiden Strukturen konnte für Monomer A zwischen den Aminosäuren 4-100 und im Monomer B zwischen den Aminosäuren 300-400 festgestellt werden (Tab. 7A). Die Berechnung der Strukturunterschiede zwischen den einzelnen Monomeren in EcoRII-WT und R88A zeigte im Gegensatz dazu nur geringe Unterschiede. Die Abweichung zwischen den WT- und der R88A-Monomere betrug für Monomer A 1,18 Å und für Monomer B 0,95 Å (Tab. 7B).

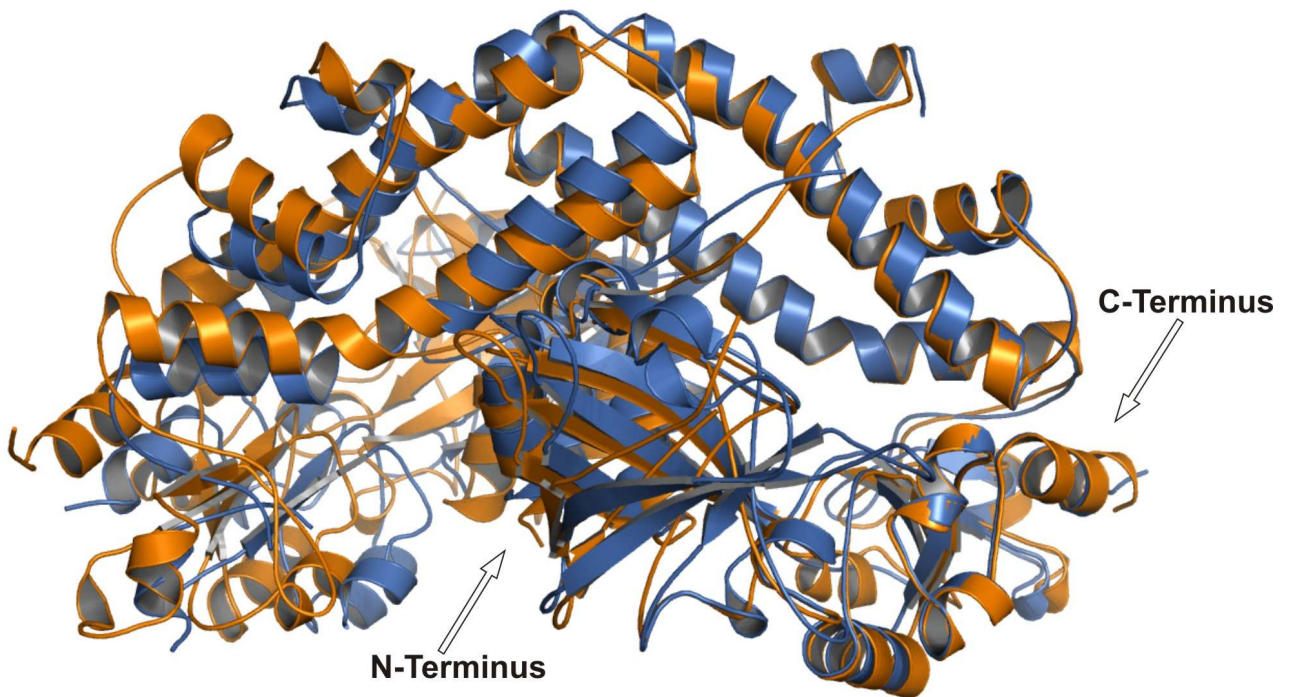


Abbildung 13: Darstellung der R88A-Mutanten- (PDB Eintrag 1NA6) und der EcoRII-WT Struktur. Die Überlagerung der Dimere wurde mit „DeepView“ durchgeführt, wobei alle Aminosäuren für die Überlagerung berücksichtigt wurden. Der N- und C-Terminus des Monomer A werden durch Pfeile angedeutet. Die EcoRII-WT Struktur ist blau und die R88A Mutante ist orange dargestellt.

Tabelle 7: Berechnung der strukturellen Standardabweichung mittels „root mean square deviation“ (RMS) zwischen EcoRII und der R88A-Mutante (PDB Eintrag 1NA6) in [Å]

RMS zwischen EcoRII R88A- und EcoRII-WT Dimeren in [Å]			RMS zwischen EcoRII R88A- und EcoRII WT Monomeren in [Å]		
Berücksichtigte AS Anzahl in Monomer A	AS Positionen	RMS in [Å]	Berücksichtigte AS Anzahl in Monomer A	AS Positionen	RMS in [Å]
364	Alle	3,75	330	Alle	1,18
94	4-100	4,33			
100	100-200	3,57	Berücksichtigte AS Anzahl in Monomer B		
88	201-300	3,1	333	Alle	0,95
82	300-400	3,9			
Berücksichtigte AS Anzahl in Monomer B					
366	Alle	3,92			
74	4-100	3,99			
96	100-200	3,92			
100	200-300	3,19			
99	300-400	4,51			

A)

B)

RMS zwischen EcoRII und R88A-Mutante (PDB Eintrag 1NA6). **A)** RMS-Berechnung für beide Dimere und **B)** für alle Monomere.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die R88A-Mutante eine andere Dimerkonformation als der EcoRII-WT besitzt. Die einzelnen Monomere beider Enzyme unterscheiden sich hingegen nur geringfügig voneinander.

Charakterisierung einer neuen Mg²⁺-Bindungstasche

Für eine exakte Beschreibung der neuen EcoRII-WT Kristallstruktur wurde eine genaue Analyse der Messdaten durchgeführt. Das Strukturmodell offenbarte eine signifikante Differenzelektronendichte in der C-terminalen Region von Monomer A und B. Die Elektronendichte in Monomer B war dabei deutlicher als die in Monomer A und wurde aufgrund ihrer Anordnung und Symmetrieparameter eindeutig als zweiwertiges Ion identifiziert [90]. Dabei handelt es sich vermutlich um Mg²⁺-Ion. Das Mg²⁺-Ion befindet sich im C-terminalen Bereich von Monomer B, zwischen den Aminosäuren Ala338 und Ile341. Das Ion wird in einer ausgeprägten, elektronegativ geladenen Bindungstasche festgehalten, wo es von den Aminosäurehauptketten der Aminosäuren Ala338 und Ile341 sowie vier Wassermolekülen koordiniert wird (Abb. 14 A,B,C).

Der Abstand zwischen Isoleucin und dem Magnesiumion beträgt 2,35 Å, der Abstand zum Alanin 2,37 Å. Die Wassermoleküle befinden sich im Abstand von 2,57 Å, 2,17 Å, 2,18 Å und 2,44 Å zum Mg^{2+} -Ion und bilden dabei eine 90° Symmetrie. Die aus der Literatur bekannten und als putative Mg^{2+} -Ionenbindestelle beschriebenen Aminosäuren Asp299 und Glu337 befinden sich in unmittelbarer Nähe zu der von uns identifizierten Position (Abb. 14 B, C) [48,91].

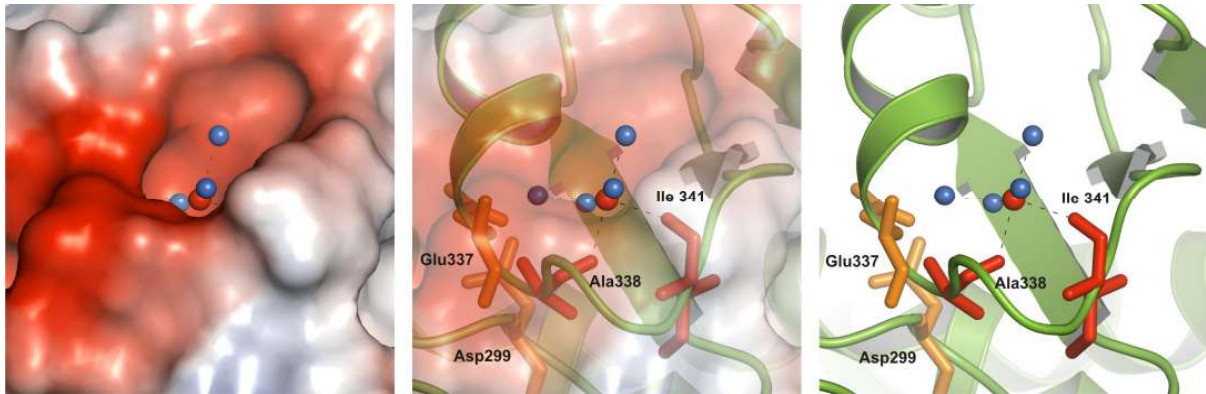


Abbildung 14: Darstellung der Mg^{2+} -Bindungstasche in der EcoRII-WT Struktur. Abbildung A) zeigt das gebundene Magnesiumion mit den interagierenden Wassermolekülen in der Oberflächen- B) und C) in einer schematischen Sekundärstrukturansicht. Die Aminosäuren Ala338 und Ile341 sind rot dargestellt. Die Aminosäuren Glu337 und Asp299 sind orange, Mg^{2+} -Ionen rot und die Wassermoleküle blau dargestellt.

Die Analyse der EcoRII-WT Kristallstruktur zeigt eine neue Mg^{2+} -Bindungstasche, die in Monomer B vollständig und Monomer A nur teilweise besetzt ist. Diese Mg^{2+} -Bindungstasche befindet sich dabei in unmittelbarer Nähe des putativen Mg^{2+} -Bindungsortes.

Der Vergleich der Mg^{2+} -Bindungstasche von EcoRII und NgoMIV offenbart einen unterschiedlichen Mg^{2+} -Bindungsmechanismus

Da nur wenige Kristallstrukturen verfügbar sind die Restriktionsendonukleasen mit gebundenem Mg^{2+} zeigen, haben wir die NgoMIV-Kristallstruktur mit gebundener DNA und zwei Mg^{2+} -Ionen zum Vergleich mit EcoRII-WT herangezogen [92,93]. Die strukturellen Ähnlichkeiten beider Enzyme ermöglichen eine präzise Gegenüberstellung [48,91]. Der Vergleich der EcoRII- und NgoMIV-Struktur zeigt einige Gemeinsamkeiten im allgemeinen Aufbau. Die Mg^{2+} -Bindungstaschen werden jeweils von

einem β -Strang, einer Schlaufe und einer α -Helix gebildet [91].

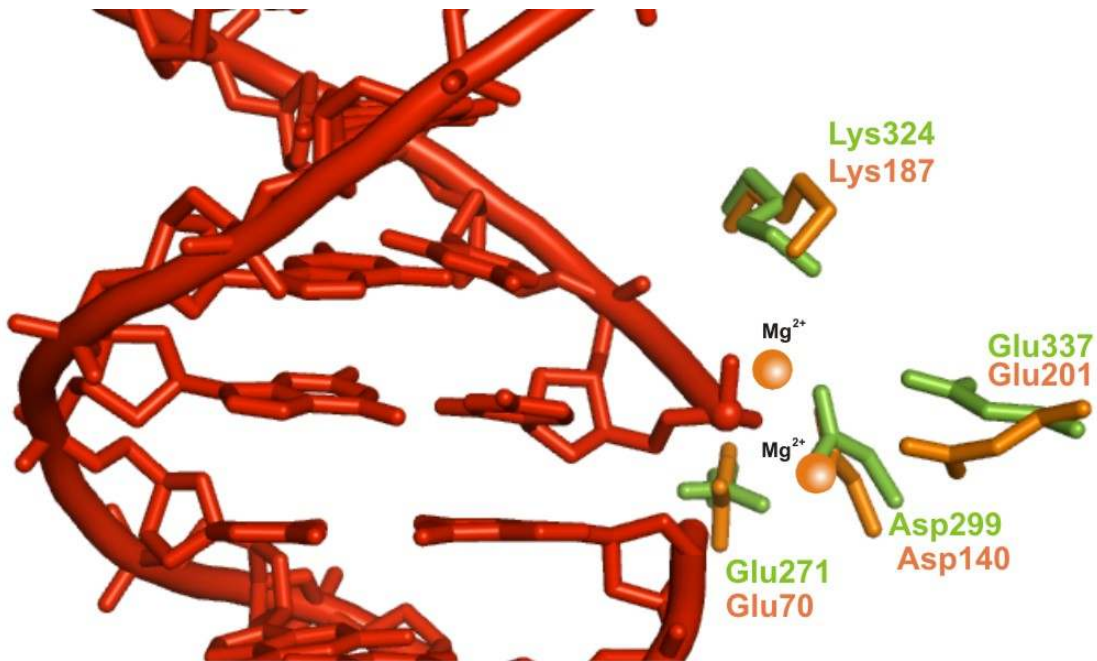


Abbildung 15: Überlagerung der putativen katalytischen Zentren von EcoRII-WT und NgoMIV (PDB Eintrag 1FIU). Die Abbildung zeigt die für die Magnesiumbindung putativ wichtigen Positionen von EcoRII (grün) und die der Kristallstruktur von NgoMIV mit gebundenen Magnesiumionen (orange) in Anwesenheit von partiell gespaltener Substrat-DNA (rot).

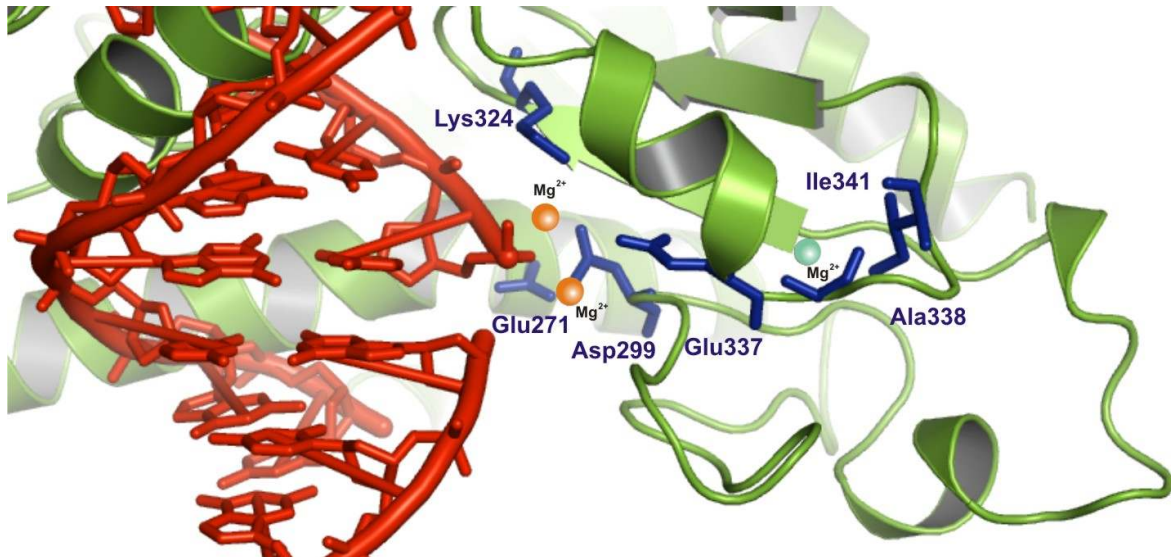


Abbildung 16: Modell der Mg²⁺-Bindungstasche von EcoRII-WT. Das Modell basiert auf der NgoMIV Struktur (PDB Eintrag 1FIU) und der neuen EcoRII-WT Struktur. Die an der Mg²⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren Glu271, Asp299, Lys324, Glu337, Ala338 und Ile341 sind blau, das Magnesiumion aus der EcoRII-WT Struktur grün, die Magnesiumionen aus der NgoMIV Struktur orange und die DNA aus der NgoMIV Struktur [93] rot dargestellt.

Bei NgoMIV befinden sich zwei Magnesiumionen in der Bindungstasche, welche direkt an der Spaltung des Phosphat-Rückgrats der DNA beteiligt sind (Abb. 15). Die beiden Mg^{2+} -Ionen werden dabei von den Aminosäuren Glu201, Asp140, Glu70 und Lys187 stabilisiert. Im Gegensatz zu NgoMIV befindet sich bei EcoRII ein einzelnes Mg^{2+} -Ion zwischen den Aminosäuren Ala338 und Ile341. Das Mg^{2+} -Ion aus der EcoRII-Struktur liegt zwischen 10,16 Å und 11,6 Å von dem putativen katalytischen Zentrum (Asp299, Glu337, Glu271 und Lys324) und somit von dem Ort der DNA-Spaltung entfernt (Abb. 16).

Unsere Ergebnisse zeigen eine von Ala338 und Ile341 gebildete Mg^{2+} -Bindungstasche, die sich von der bei NgoMIV gefundenen unterscheidet. Diese Mg^{2+} -Bindungstasche stellt möglicherweise eine Art „Depot“ für Mg^{2+} -Ionen innerhalb der EcoRII Struktur dar, die für eine schnelle Spaltreaktion in Anwesenheit der DNA notwendig ist.

Berechnung eines EcoRII-C/DNA-Modells in der katalytisch aktiven

Konformation

Für ein besseres Verständnis der DNA-Bindung und -Spaltung durch EcoRII haben wir ein EcoRII-C/DNA-Modell erstellt, das das Enzym in der katalytisch aktiven Konformation zeigt. Ecl18KI eignet sich aufgrund der hohen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zur C-terminalen EcoRII-Domäne besonders gut als Homologiemodell und wurde deshalb als Grundlage für unser Modell verwendet [53,94]. Für die Erstellung des Modells wurde die Ecl18KI-Struktur (PDB Eintrag 2FQZ) mit gebundener DNA verwendet, wobei das zentrale Basenpaar A/T aus der Erkennungssequenz (CCA/TGG) „herausgeflippt“ ist.

Das EcoRII-C/DNA-Modell zeigt das Enzym mit seiner natürlichen Substrat-DNA mit der Sequenz 5'-CGCCAGGGC-3' (Abb. 17 links). Bei der katalytisch aktiven Konformation von EcoRII-C handelt es sich um ein Dimer, das aus den C-terminalen Domänen gebildet wird (Aminosäure 173-404). Unser Modell zeigt, dass die beiden scherenförmig angeordneten α -Helices H10 und H11 in Monomer A und B die DNA vollständig umschließen. Die an der Stabilisierung der „herausgeflippten“ Base beteiligten Aminosäuren befinden sich wie vorhergesagt an den Positionen Arg222, Tyr226 sowie Glu225 und bilden dort eine Tasche [94]. Der Vergleich unseres theoretischen Modells mit einer kürzlich veröffentlichten EcoRII-C Struktur mit DNA zeigt

große Übereinstimmungen (Abb. 17 rechts): Die im Ko-Kristall beschriebenen Aminosäuren, die am „Herausflippen“ der zentralen A/T-Basen beteiligt sind, stimmen mit unserem Modell überein [54]. Die größte Abweichung zwischen unserem Modell und der Ko-Kristallstruktur liegt in der Anordnung der scherenförmigen α -Helices H10 und H11 (Abb. 17). Diese Helices sind in der Ko-Kristallstruktur gekrümmt, was ein noch engeres Anschmiegen des Enzyms an die DNA ermöglicht. Ein ebenfalls von unserem Modell abweichender Bereich befindet sich in der Region von β -Strang B11 und α -Helix H14 (Abb. 17). Diese Region ist in unserem Modell als mögliche Dimerisierungsregion zwischen den beiden Monomeren vorhergesagt worden und sollte zu einer vollständigen DNA-Umschließung führen. Der Vergleich unseres Modells mit der Ko-Kristallstruktur zeigt allerdings, dass diese Region nicht dimerisiert (Abb. 17).

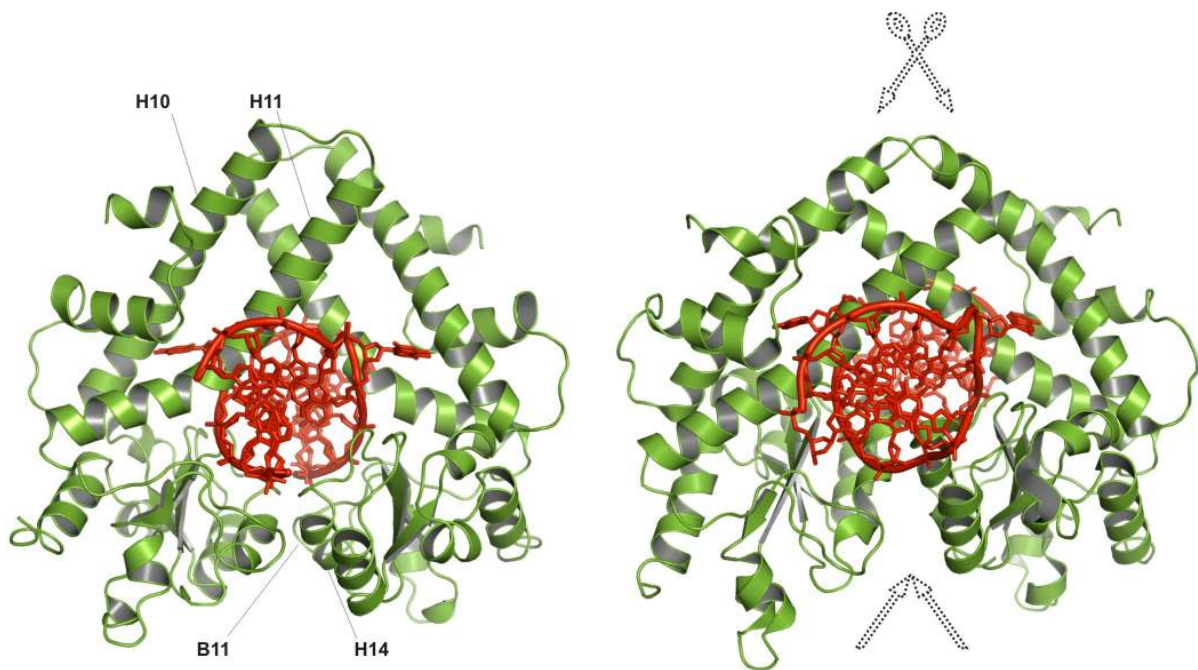


Abbildung 17: EcoRII-C Homologiemodell im Vergleich mit der Ko-Kristall Struktur. EcoRII-C/DNA-Modell (links) und Ko-Kristallstruktur (PDB Eintrag 3HQG) (rechts) [54]. Die Strukturen zeigen EcoRII-C (grün) mit der Substrat-DNA (rot). Die scherenförmigen, gestrichelten Pfeile (rechts oben) zeigen auf die α -Helices H10 und H11 (Aminosäure 220-270 (Abb. 9)). Die aufeinander zulaufenden, gestrichelten Pfeile (rechts unten) deuten auf β -Strang B11 und α -Helix H14 (Aminosäuren 320-340 (Abb. 9)).

Unser theoretisches EcoRII-C/DNA-Modell zeigt EcoRII-C zum ersten Mal mit seinem natürlichen Substrat und ermöglicht somit einen Einblick in den DNA-Bindungs- und DNA-Spaltmechanismus. Der Vergleich unseres Homologiemodells mit der kürz-

lich veröffentlichten Ko-Kristallstruktur bestätigt die Richtigkeit unseres Modells und offenbart nur geringe Abweichungen zwischen den beiden Strukturen.

Berechnung eines EcoRII/DNA-Modells in der katalytisch inaktiven

Konformation

Um einen Einblick in den EcoRII Reaktionsmechanismus zu erhalten, haben wir basierend auf der neuen Ko-Kristallstruktur der N-terminalen EcoRII Domäne (PDB Eintrag 3HQF) [54] ein Modell erstellt, das das komplette Enzym mit DNA in der katalytisch inaktiven Konformation zeigt. Dabei wurde die Struktur der N-terminalen Domäne mit gebundener DNA in unsere neue EcoRII-WT Struktur eingepasst (Abb. 18). Die Berechnung der strukturellen Standardabweichung zwischen den beiden Strukturen zeigte dabei, dass sich beide nur geringfügig voneinander unterscheiden und eine Modellerstellung möglich ist (Tab. 8).

Tabelle 8: Berechnung der strukturellen Standardabweichung (RMS) zwischen EcoRII und dem Ko-Kristall EcoRII-N mit DNA (PDB Eintrag 3HQF)

Berücksichtigte AS Anzahl	AS Positionen	RMS in [Å]	
139	4-174	0,9	Monomer A
153	4-174	0,92	Monomer B

In der katalytisch inaktiven Konformation befinden sich die beiden N-terminalen Domänen eng an der C-terminalen Domäne, wodurch das putative katalytische Zentrum (Glu271, Asp299, Lys324 und Glu337) verschlossen wird (Abb. 18) [48]. Unser Modell zeigt einen katalytisch inaktiven Zustand, bei dem beide N-terminalen Domänen jeweils ein DNA-Molekül gebunden haben, das katalytische Zentrum für eine Spaltreaktion aber noch nicht zugänglich ist (Abb. 18). Die beiden DNA-Moleküle befinden sich dabei in einer Entfernung von rund 74 Å und sind in einer antiparallelen Orientierung angeordnet.

Das von uns erstellte EcoRII/DNA-Modell in der katalytisch inaktiven Konformation zeigt EcoRII bei einer gleichzeitigen Bindung von zwei DNA-Molekülen. Diese Konformation könnte einen Zwischenschritt im EcoRII Reaktionsmechanismus darstellen, der für die simultane Bindung von zwei DNA-Molekülen notwendig ist.

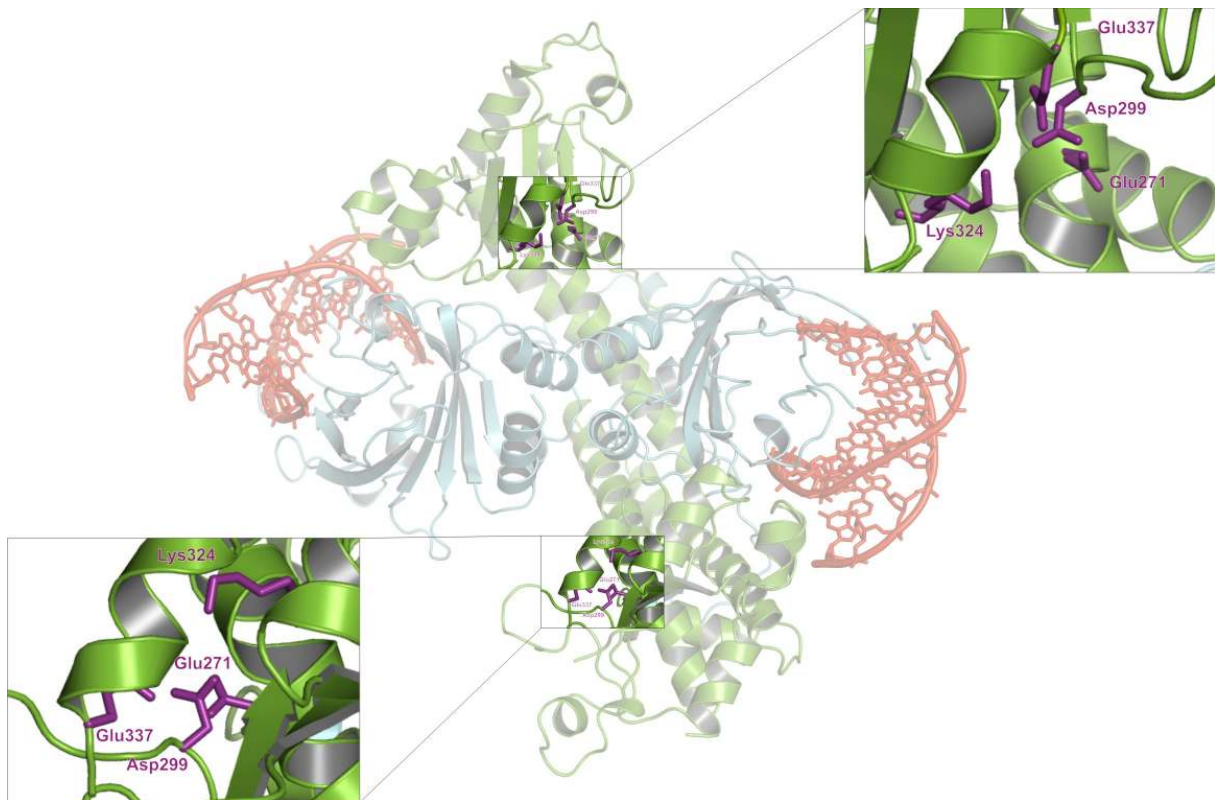


Abbildung 18: Modell von EcoRII mit zwei gebundenen DNA-Molekülen basierend auf der Ko-Kristallstruktur von EcoRII-N (PDB Eintrag 3HQF) [54] und der neuen EcoRII-WT Struktur. Die N-terminalen Domänen beider Monomere sind blau, die C-terminalen Domänen sind grün und die Substrat-DNA ist jeweils rot dargestellt. Die das putative katalytische Zentrum bildenden Aminosäuren (Asp299, Glu337, Glu271 und Lys324) sind in den vergrößerten Bereichen beider Monomere violett dargestellt.

Untersuchung der Interaktion von EcoRII mit der „kleinen Furche“ der DNA

Die Erstellung des EcoRII/DNA-Modells in der katalytisch inaktiven Konformation ermöglichte uns einen ersten Einblick in den Reaktionsmechanismus des kompletten Enzyms. Eine detaillierte Analyse unseres Modells offenbarte weitere interessante Details. Unser Modell zeigte Einzelheiten der DNA-Bindung, die bei der Betrachtung der Ko-Kristallstruktur (PDB Eintrag 3HQF) allein nicht sichtbar sind, da diese nur die N-terminale EcoRII-Domäne mit DNA zeigt. Unser Modell hingegen, das die N- und C-terminale Domäne beinhaltet, zeigt das komplette Enzym in der natürlichen Konformation, die die Situation *in vivo* widerspiegelt. Dieses Modell zeigt, dass zusätzlich zu den eindeutigen Kontaktstellen der DNA mit den Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Enzyms auch Interaktionspunkte im C-terminalen Bereich vorhanden sind.

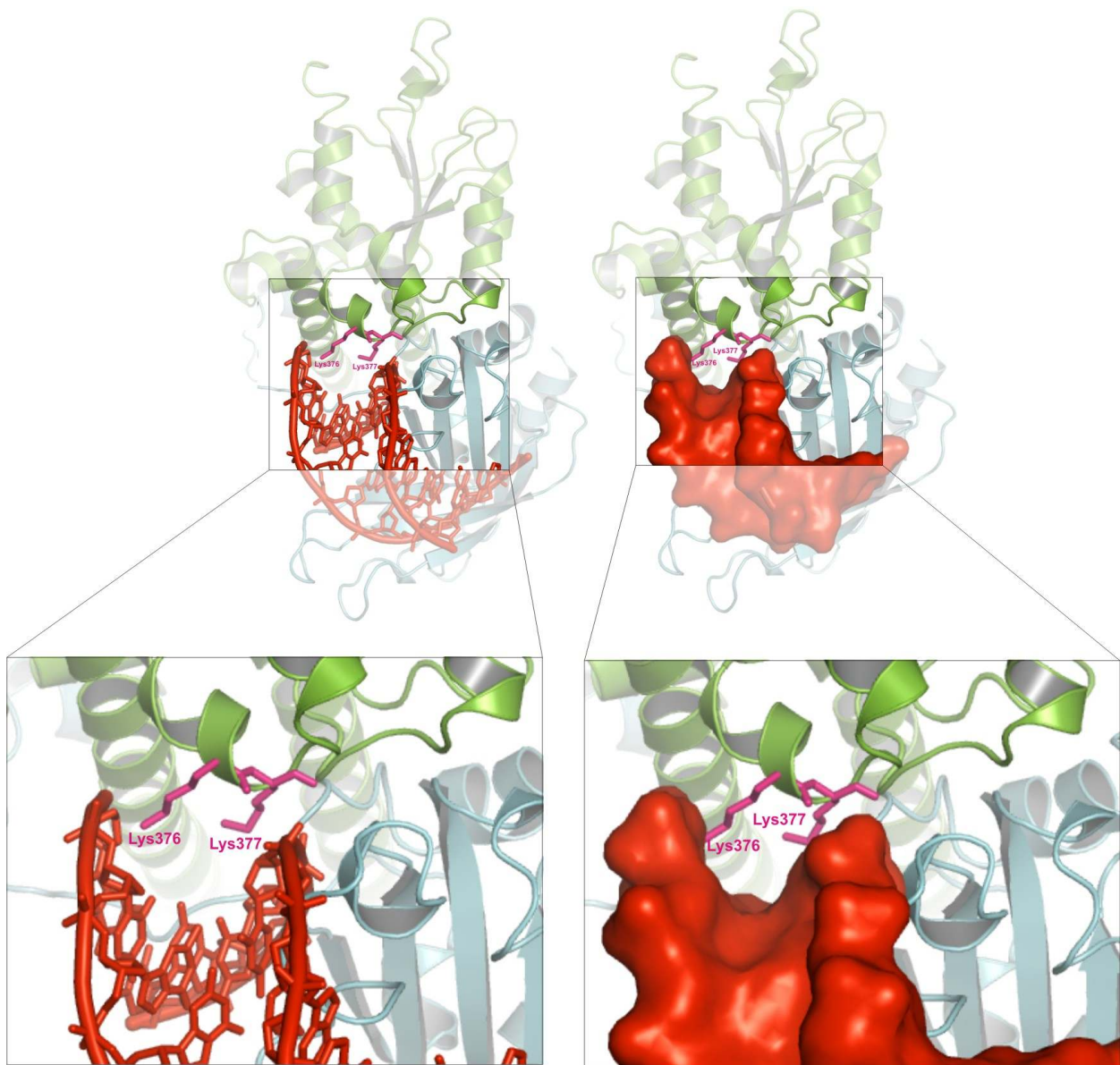


Abbildung 19: Modell von EcoRII-WT Monomer mit gebundener Substrat-DNA, basierend auf der Ko-Kristallstruktur der N-terminalen EcoRII-Domäne (PDB Eintrag 3HQF) [54]. Die C-terminale Domäne ist grün, die N-terminale Domäne blau und die DNA rot dargestellt. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die über die „kleine Furche“ der DNA interagierenden, neu beschriebenen Aminosäuren Lys376 und Lys377 (pink). Die Abbildung rechts zeigt die Simulation der Oberflächenbeschaffenheit der DNA.

Es zeigte sich, dass die Aminosäuren Lys376 und Lys377 mit der DNA über die „kleine Furche“ der DNA interagieren (Abb. 19). Die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäuren und der DNA befindet sich außerhalb der eigentlichen EcoRII-Erkennungssequenz. Die Aminosäuren stellen somit eine zusätzliche DNA-Bindungsregion dar, die die benachbarten Basenpaare außerhalb der Erkennungssequenz bindet (Abb. 20, 21). Die Berechnung der Interaktionspunkte zwischen Enzym und DNA mittels FoldX ergab, dass Lys376 und Lys377 mit dem Basen CG an

der Position drei und vier im T-Strang interagieren (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäuren Lys376 und Lys377 könnten dabei als eine Art Abstandshalter wirken, der die Breite der „kleinen Furche“ determiniert.

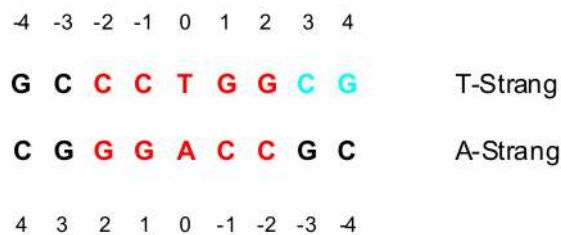


Abbildung 20: Schematische Darstellung der DNA-Sequenz aus dem Ko-Kristall (3HQF) [54] bzw. dem katalytisch inaktiven EcoRII/DNA-Modell (Abb. 19). Die EcoRII-Erkennungssequenz ist rot, die neuen Interaktionsstellen mit der „kleinen Furche“ der DNA sind türkis dargestellt.

Die Ergebnisse unserer Analyse zeigen, dass die Bindung durch die Aminosäuren Lys376 und Lys377 über die „kleine Furche“ der DNA eine zusätzliche DNA-Bindungsregion in EcoRII darstellen könnten (Abb. 21).

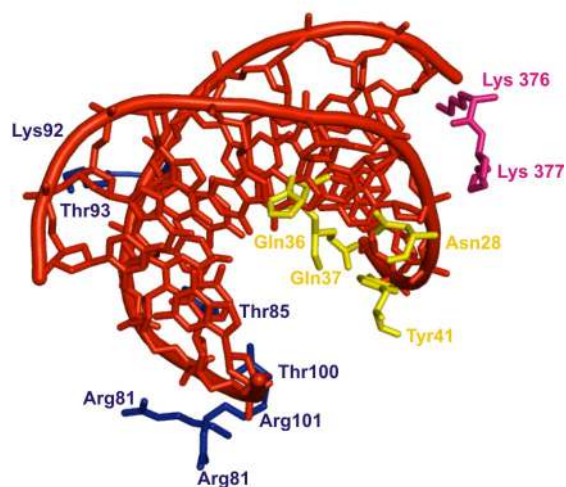


Abbildung 21: Zusammenstellung aller Aminosäuren, die an der EcoRII vermittelten DNA-Bindung in der katalytisch inaktiven Konformation beteiligt sind. Die durch das Ko-Kristall (PDB Eintrag 3HQF) [54] identifizierten, an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren 28-41 und 81-101 sind gelb bzw. blau dargestellt [54]. Die durch das katalytisch inaktive Modell vorhergesagten Aminosäuren sind pink, die Substrat-DNA ist rot dargestellt.

Funktionelle Bedeutung des “minor groove” Bindungsmotives in EcoRII

Um die Bedeutung der von uns neu beschriebenen, an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren zu untersuchen, wurde eine Mutante hergestellt, bei der die Positionen Lys376 und Lys377 durch Alanine ersetzt wurden. Das Mutantenzym EcoRII K376A-K377A wurde in DNA-Spaltexperimenten und EMSA-Experimenten untersucht. Dabei zeigte sich, dass EcoRII K376A-K377A pBR322 Plasmid-DNA effizient schneiden kann. Die Ansätze mit T3 Phagen-DNA zeigten hingegen keine Spaltaktivität. EcoRII K376A-K377A verfügte über die gleiche Spaltaktivität wie EcoRII-WT Enzym (Daten nicht gezeigt). Um die Bindungseigenschaften von EcoRII K376A-K377A zu untersuchen wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Das Mutantenzym verfügte im Vergleich zu EcoRII-WT über eine zweifach schwächere DNA-Bindung (Daten nicht gezeigt). Die durch EcoRII K376A-K377A gebildeten Protein/DNA-Komplexe unterschieden sich ebenfalls von den durch das WT-Enzym gebildeten Komplexen (Abb. 22). Die für die EcoRII/DNA-Komplexe typische Doppelbande in EMSA-Experimenten ist im Fall des Mutantenzym nicht mehr zu erkennen.

Die Substitution der Aminosäuren Lys376 und Lys377 durch Alanine zeigte ein verändertes Laufverhalten des Mutantenzym in EMSA-Experimenten, was auf eine veränderte Protein-DNA-Komplexbildung schließen lässt.

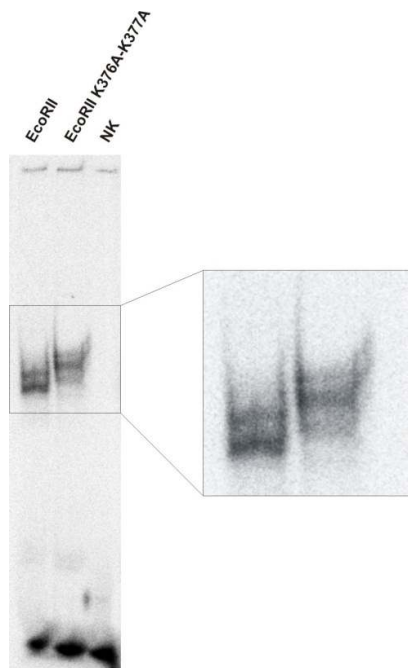


Abbildung 22: EMSA-Experimente mit EcoRII sowie EcoRII K376A-K377A. Die Ansätze wurden mit radioaktiv markierter DNA (Tab. 3) und 50 nM Enzym für 30 Minuten inkubiert und in einem nativen 1X TBE Gel aufgetrennt.

3.3 Biochemische und strukturelle Untersuchung der EcoRII DNA-Methyltransferase

Klonierung, Überexpression und Reinigung der EcoRII DNA-Methyltransferase

Um M.EcoRII untersuchen zu können, klonierten wir die für die Methyltransferase kodierende Sequenz aus dem pDK1 Plasmid im Überexpressionsvektor pQE-30 (Qiagen). Das auf diesem Weg hergestellte DNA-Konstrukt pQE30-M.EcoRII verfügte über einen N-terminalen 6xHis-Tag, der uns erlaubte, das Protein mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie zu reinigen (Abb. 23). Die Überexpression wurde durch die Induktion mit IPTG erreicht. Das mit Ni-NTA vorgereinigte Protein wurde anschließend mittels FPLC und Heparin-Agarose Säule bis zur Homogenität gereinigt.

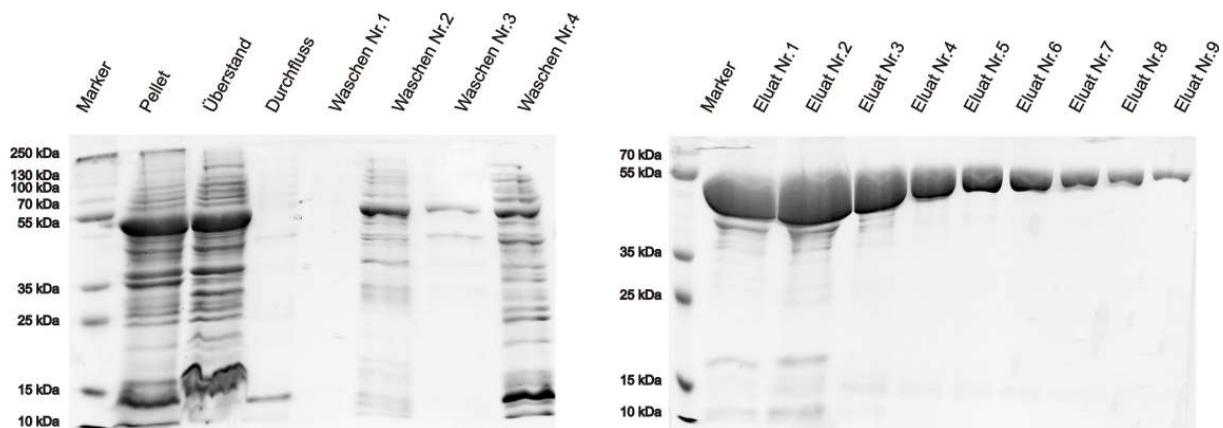


Abbildung 23: Reinigung von M.EcoRII aus *E. coli* JM109 (pQE-30 M.EcoRII) nach Induktion mit IPTG. Das linke Gel zeigt die Proteine im Überstand nach Aufschluss, im Bakterienpellet und den darauffolgenden Reinigungsschritten. Für die Waschschrte wurden jeweils 10 μ l der Probe und 5 μ l des resuspendierten Pellets auf das Gel aufgetragen. Das rechte Bild zeigt die gereinigte Methyltransferase nach der Elution. Dabei sind jeweils 10 μ l für jede Fraktion auf das Gel aufgetragen worden. Als Marker wurde der PageRuler™ Plus (Fermentas) verwendet.

Es ist uns gelungen, die EcoRII DNA-Methyltransferase in einen Überexpressionsvektor zu klonieren und bis zur Homogenität im Milligramm-Maßstab zu reinigen, eine Voraussetzung für eine strukturelle und funktionelle Untersuchung.

Charakterisierung der Aktivität von M.EcoRII sowie der verkürzten Mutantenenzyme M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512

Für eine funktionelle und strukturelle Untersuchung von M.EcoRII haben wir zwei weitere Konstrukte hergestellt. Wir klonierten zwei verkürzte Konstrukte, M.EcoRII 1-113, dem die C-terminalen 399 Aminosäuren fehlten und M.EcoRII 114-512, dem die N-terminalen 113 Aminosäuren fehlten. Die Reinigung der verkürzten Proteine ist in Abbildung 24 dargestellt. Um zu überprüfen, ob unsere Konstrukte trotz N-terminalem 6xHis-Tag in der Lage sind DNA spezifisch zu methylieren, führten wir Methylierungsexperimente mit M.EcoRII durch, die anschließend mit EcoRII verdaut wurden. Es wurde dabei deutlich, dass der 6xHis-Tag keinen negativen Einfluss auf die Methylierungsaktivität hatte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass M.EcoRII 114-512 einen schwächeren Schutz vor Spaltung im Vergleich mit M.EcoRII bietet und damit auf eine schlechtere Methylierungsaktivität schließen lässt (Abb. 25). M.EcoRII 1-113 zeigte keinerlei protektiven Schutz vor Spaltung mit EcoRII und war somit nicht in der Lage DNA zu methylieren (Abb. 25).

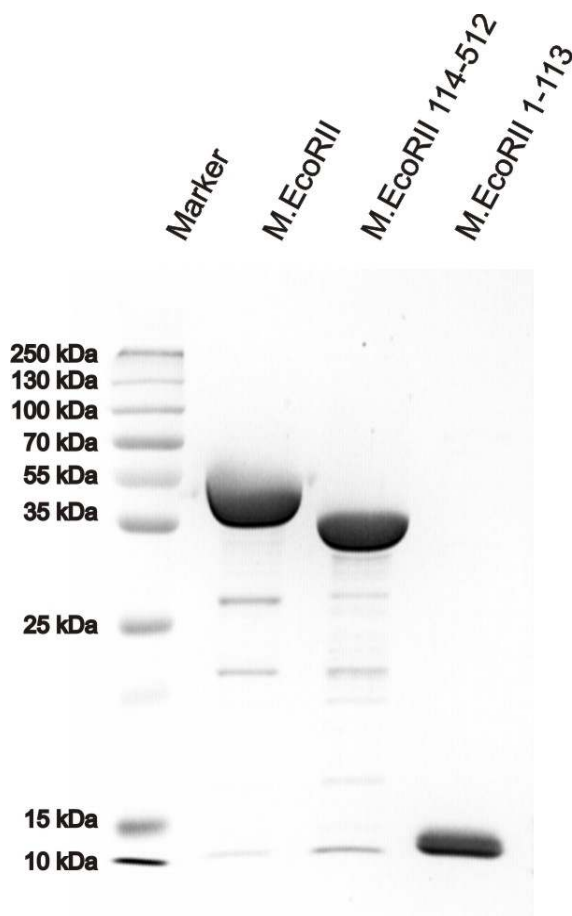


Abbildung 24: 12% SDS-Gel mit M.EcoRII und den verkürzten Mutantenproteinen. Die Abbildung zeigt die gereinigten, verkürzten Enzyme im Vergleich zu dem vollständigen M.EcoRII-Enzym. Die theoretischen Molekulargewichte der Proteine betragen für M.EcoRII ca. 58 kD, für M.EcoRII 114-512

ca. 46 kD und für M.EcoRII 1-113 ca. 13 kD. Als Marker wurde der PageRuler™ Plus (Fermentas) verwendet.

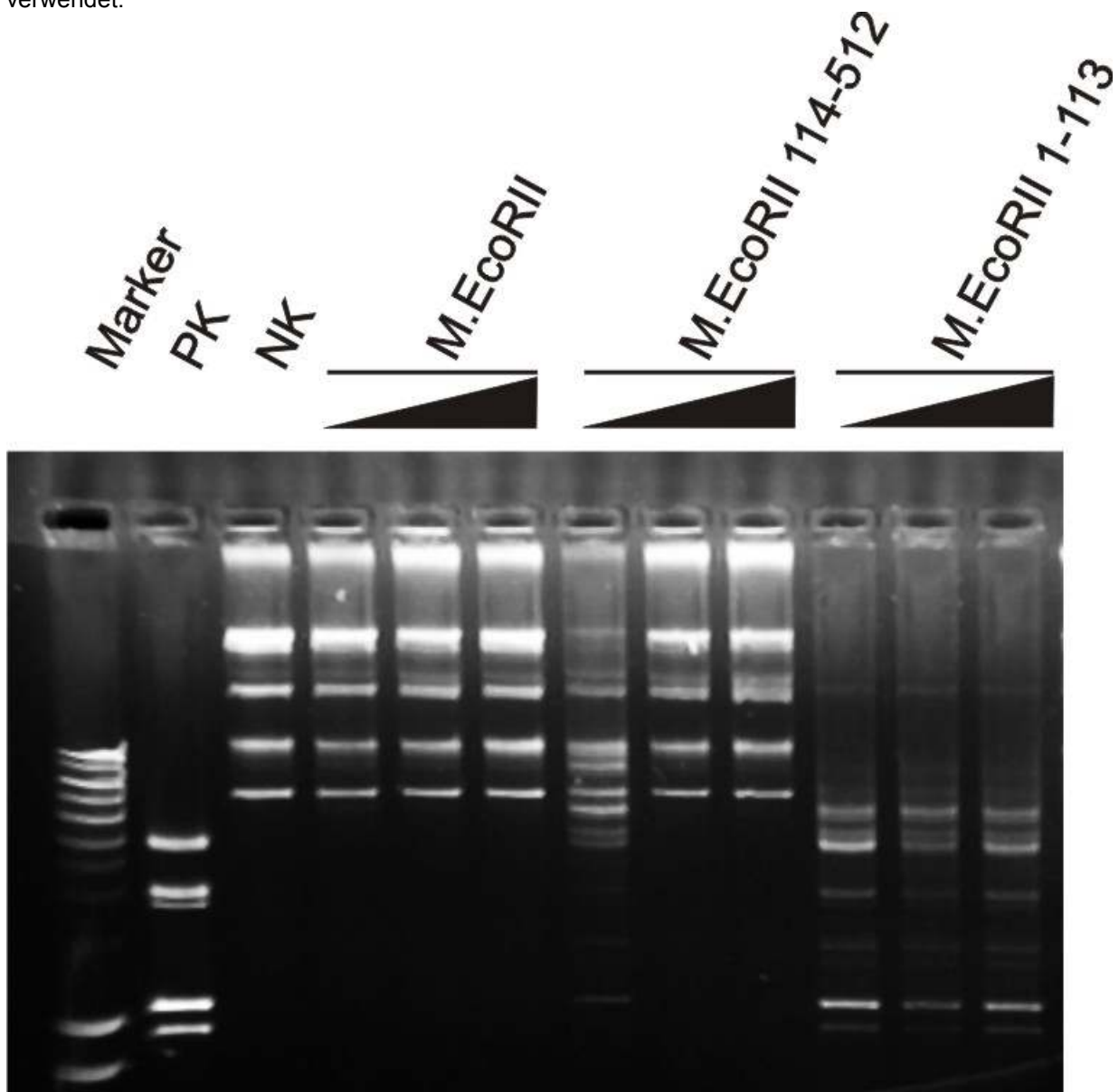


Abbildung 25: DNA-Methylierungstest mit M.EcoRII und den M.EcoRII-Derivaten. Die Ansätze wurden mit 150 ng pBR322-Plasmid-DNA, 0.5 mM AdoMet und steigenden Proteinmengen von M.EcoRII, M.EcoRII 114-512 und M.EcoRII 1-113 im 1X Reaktionspuffer für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden danach mittels Phenol-Chloroform gereinigt und anschließend für eine Stunde bei 37°C mit EcoRII verdaut. Die Proben wurden dann in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. PK bezeichnet die Positivkontrolle, bei der nichtmethylierte pBR322-DNA mit EcoRII verdaut wurde. NK bezeichnet die Negativkontrolle bei der pBR322-DNA unverdaut aufgetragen wurde. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Der verwendete Marker war dabei der „Smart ladder“ (Eurogentec).

Unsere Experimente zeigen, dass der 6xHis-Tag keinen negativen Einfluss auf die Methylierungsaktivität ausübt. Wir konnten zeigen, dass das N-terminal verkürzte Enzym M.EcoRII 114-512 pBR322-DNA vollständig methylieren kann. Das C-terminal verkürzte Enzym M.EcoRII 1-113 zeigte im Gegensatz dazu keine Methylierungsaktivität an pBR322-DNA.

Charakterisierung der DNA-Bindung von M.EcoRII, M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512 mittels EMSA

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass M.EcoRII in Anwesenheit von AdoHcy mit hoher Affinität an den eigenen Erkennungsort binden kann [78,79,80]. M.EcoRII war die erste Methyltransferase für die gezeigt wurde, dass sie außerdem an den eigenen Promotor binden und dabei die eigene Transkription regulieren kann [74,75,76]. Um die Bindung von M.EcoRII an DNA besser analysieren zu können, haben wir M.EcoRII sowie die Mutantenproteine M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512 in EMSA-Experimenten untersucht. Unsere Experimente zeigten, dass M.EcoRII und M.EcoRII 114-512 mit hoher Affinität in Anwesenheit von AdoHcy an den eigenen

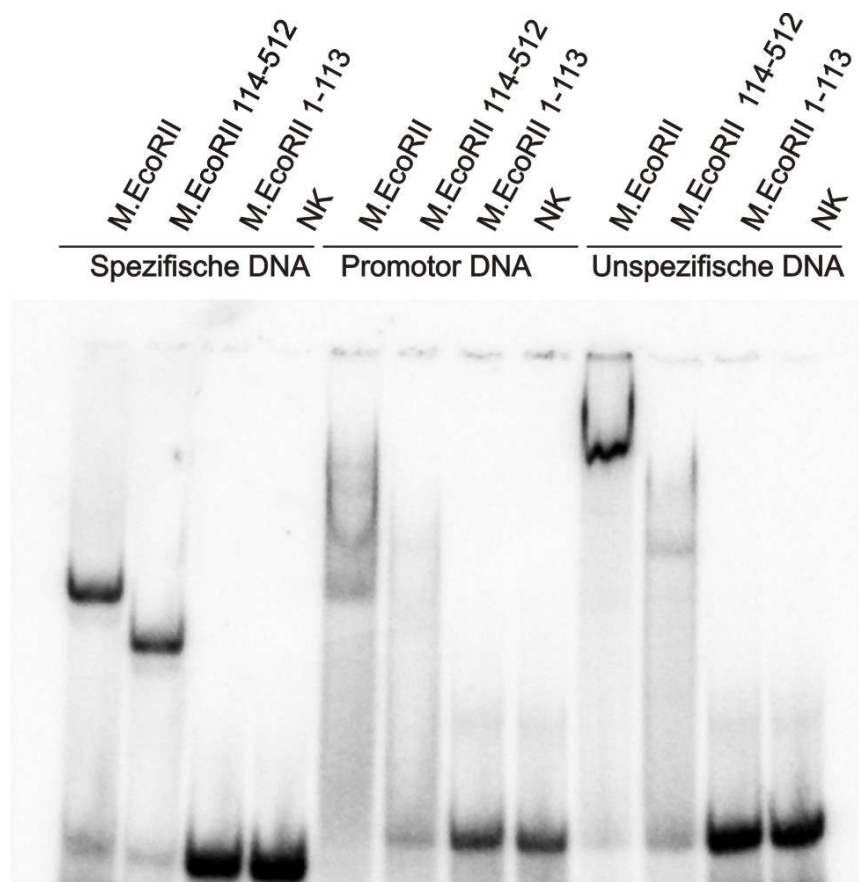


Abbildung 26: EMSA-Experimente mit M.EcoRII und den verkürzten Proteinen M.EcoRII 114-512 und M.EcoRII 1-113. Die Ansätze mit spezifischer DNA enthielten radioaktiv markierte 13 bp lange Oligonukleotide mit dem EcoRII-Erkennungsort (0,01 pmol) und jeweils 100 nM der entsprechenden Enzyme. Für die Ansätze mit der Promotor DNA wurden 0,01 pmol der 38 bp langen M.EcoRII Promotor DNA und 500 nM der entsprechenden Enzyme verwendet. Die Proben mit der unspezifischen DNA enthielten 0,01 pmol der unspezifischen 38 bp lange DNA und jeweils 1000 nM der jeweiligen Enzyme. Alle Ansätze enthielten AdoHcy und wurden mit der jeweiligen DNA (Tab. 3) für 30 Minuten inkubiert und in nativen Polyacrylamidgelen in 1XTBE aufgetrennt.

Erkennungsort binden können, M.EcoRII 1-113 dagegen nicht (Abb. 26).

Die Bindung an die vollständige Promotorsequenz ist im Gegensatz dazu kofaktorunabhängig und findet mit und ohne Kofaktoren gleichermaßen effizient statt (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob die gesamte Promotorsequenz für die spezifische Bindung notwendig ist, haben wir auch Experimente mit verkürzten Promotorsequenzen durchgeführt. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der EMSA-Experimente zusammen und zeigt, dass die Bindung von M.EcoRII an eine verkürzte Promotorsequenz drastisch herabgesetzt war. Dabei verringerte sich die Affinität um das 15-fache, verglichen mit der ganzen Promotorsequenz.

Die EMSA-Experimente mit den verkürzten Mutanten zeigten, dass die N-terminal verkürzte Mutante M.EcoRII 114-512 eine 9-fach schlechtere Bindung an den Erkennungsort aufwies. Die Bindung von M.EcoRII 114-512 an die vollständige Promotorsequenz war dabei um das 6,6-fache schwächer. Die Affinität von M.EcoRII 114-512 zur unspezifischen DNA blieb im Gegensatz dazu unverändert.

Die C-terminal verkürzte Mutante M.EcoRII 1-113 zeigte im Gegensatz zu M.EcoRII 114-512 keinerlei DNA-Bindung. Wir konnten für M.EcoRII 1-113 bei einer Höchstkonzentration von 2,5 μ M keine Bindung an Erkennungsort-, Promotor- oder an unspezifische DNA beobachten (Daten nicht dargestellt). Abbildung 26 stellt das unterschiedliche Laufverhalten aller untersuchten Mutanten dar.

Die EMSA-Experimente offenbarten, dass die N-terminal verkürzte Mutante (M.EcoRII 114-512) Erkennungsort- und Promotorsequenz-DNA abgeschwächt binden kann. Die C-terminal verkürzte Mutante (M.EcoRII 1-113) ist nicht in der Lage DNA zu binden (Tab. 9).

Tabelle 9: Zusammenfassung der k_D -Werte für M.EcoRII, M.EcoRII 1-113 und M.EcoRII 114-512

	38 bp Promotor DNA [nM]	15 bp Promotor DNA [nM]	38 bp unspezifische DNA [nM]	Erkennungsort DNA [nM]
M.EcoRII	59,3	910	616,6	9,5
M.EcoRII 1-113	> 2500	n.d.	> 2500	> 2500
M.EcoRII 114-512	400	n.d.	675	82,5

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die Berechnung der K_D -Werte wurden mindestens drei unabhängige Experimente gemittelt. N.d. bezeichnet Experimente, die nicht durchgeführt wurden.

Proteolytische Spaltung von M.EcoRII zur Bestimmung von stabilen Domänen in Anwesenheit von verschiedenen DNA-Sequenzen und unterschiedlichen Kofaktoren

Zur Identifizierung der Domänenarchitektur von M.EcoRII führten wir proteolytische Spaltungen des Enzyms in Abhängigkeit verschiedener Kofaktoren sowie DNA-Sequenzen durch. In den Experimenten zeigte sich dabei, dass M.EcoRII in Abwesenheit von DNA im Verlauf von acht Stunden vollständig verdaut wird. Bereits nach einer Stunde ist der größte Teil dieser Reaktion abgeschlossen (Abb. 27 A). Bei den Experimenten mit M.EcoRII und der Promotorsequenz-DNA zeigte sich eindrucksvoll, dass zwei Fragmente vor proteolytischer Spaltung geschützt wurden. Diese beiden Fragmente entstanden ohne nennenswerte Zwischenprodukte bereits nach 30 Minuten und blieben auch über den gesamten Zeitverlauf geschützt (Abb. 27 B). Sie sind im Vergleich zu den Markerbanden etwa 35 kD und 25 kD groß. Die Experimente mit unspezifischer DNA zeigten ebenfalls die Entstehung zweier ähnlich großer Fragmente, die aber nicht über den gesamten Zeitverlauf geschützt wurden und bereits nach zwei Stunden fast vollständig verdaut wurden (Abb. 27 C). Bei den Experimenten mit der spezifischen Erkennungssequenz konnten wir beobachten, dass das komplette Protein über den gesamten Zeitraum vor tryptischen Verdau geschützt war (Abb. 27 D). Wir konnten dabei eine kleine Population der bekannten 35 kD und 25 kD großen Fragmente sowie einen geringen Anteil eines um etwa 10 kD verkürzten, ansonsten unverdauten Enzyms beobachten.

Um den Einfluss verschiedener Additive (AdoMet, AdoHcy und Sinefungin) auf die Bildung der stabilen Fragmente zu untersuchen, haben wir weitere Proteolyse-Experimente durchgeführt. Die Additive AdoMet, AdoHcy und Sinefungin vermittelten allein keinen Schutz vor proteolytischer Spaltung (Daten nicht gezeigt). Die Bildung der stabilen Fragmente in Anwesenheit der Promotorsequenz-DNA war unabhängig von den Additiven und erfolgte für AdoHcy, AdoMet sowie Sinefungin gleichermaßen effizient (Abb. 28). Die Anwesenheit der unspezifischen DNA hatte in Kombination mit allen drei verwendeten Additiven nur einen schwachen protektiven Effekt, wobei das Fehlen eines der drei Additive das Protein besonders schlecht vor Spaltung schützte (Abb. 28). Bei den Experimenten mit spezifischer DNA zeigte sich, dass die Wahl des Additives die Formation der spezifischen Fragmente beeinflusst. Die Ansätze mit AdoHcy und spezifischer DNA zeigen die Bildung eines um etwa 10 kD verkürzten

Proteins (Abb. 28). Im Gegensatz dazu entstanden bei Experimenten mit AdoMet und Sinefungin zwei Fragmente, ein 35 kD und 25 kD großes Fragment (Abb. 28).

Proteolytische Experimente zeigten, dass M.EcoRII in Anwesenheit von AdoHcy und der Erkennungsort-DNA vor tryptischen Verdau fast vollständig geschützt ist. Die Inkubation von M.EcoRII mit der Promotorsequenz führt im Gegensatz dazu kofaktorunabhängig zu der Bildung zweier stabiler Fragmente (35 kD und 25 kD).

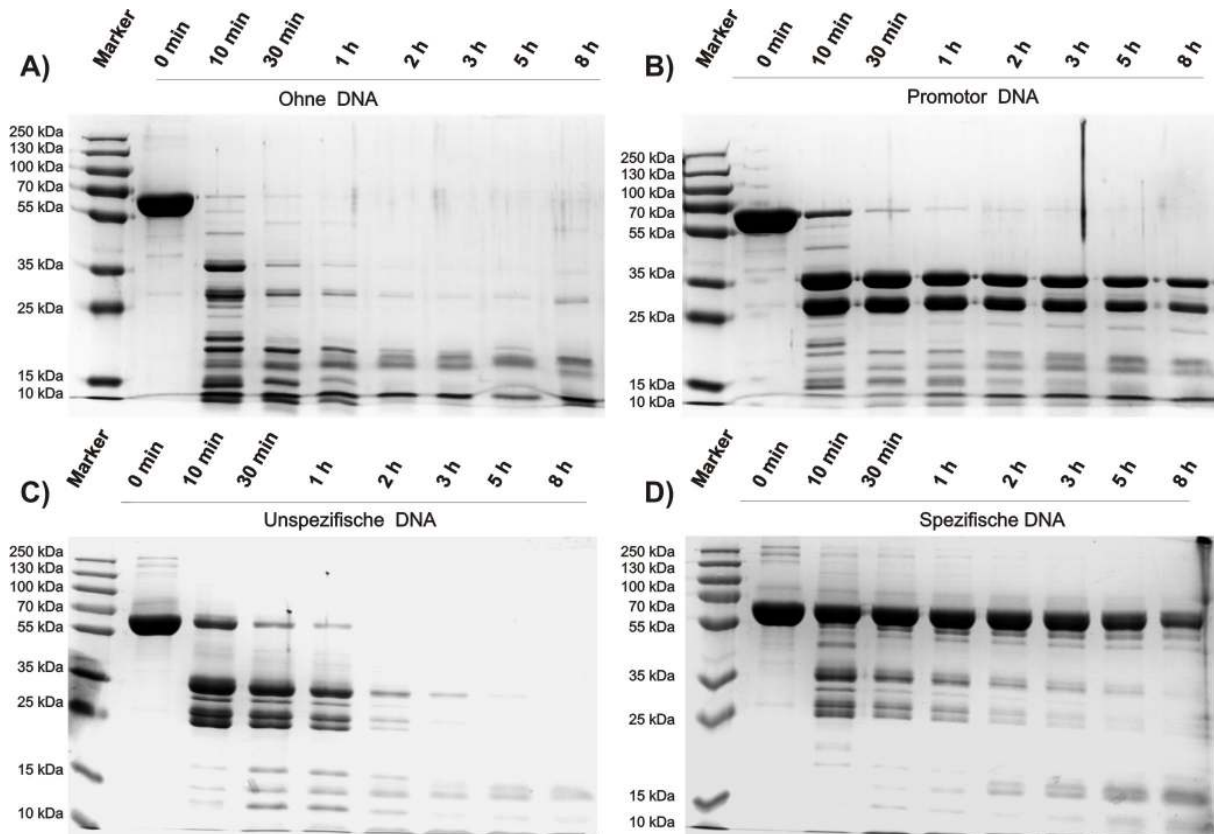


Abbildung 27: Proteolytische Spaltung von M.EcoRII in Anwesenheit von verschiedenen DNA-Sequenzen. 3 mg M.EcoRII wurden jeweils in einem Volumen von 120 μ l in 100 mM Tris-HCl pH 7,6 mit 0,03 μ g/ μ l Trypsin bei 37°C inkubiert. Aus den 120 μ l sind zu definierten Zeitpunkten 10 μ l der Probe entnommen worden. Gel A) zeigt M.EcoRII ohne DNA. Gel B) zeigt M.EcoRII mit der 38 bp langen Promotorsequenz DNA, C) zeigt M.EcoRII mit 38 bp langer unspezifischer DNA. D) zeigt M.EcoRII mit 13 bp langer Erkennungsort-DNA. Die Proben sind anschließend auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt worden. Als Marker wurde der PageRuler™ Plus (Fermentas) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

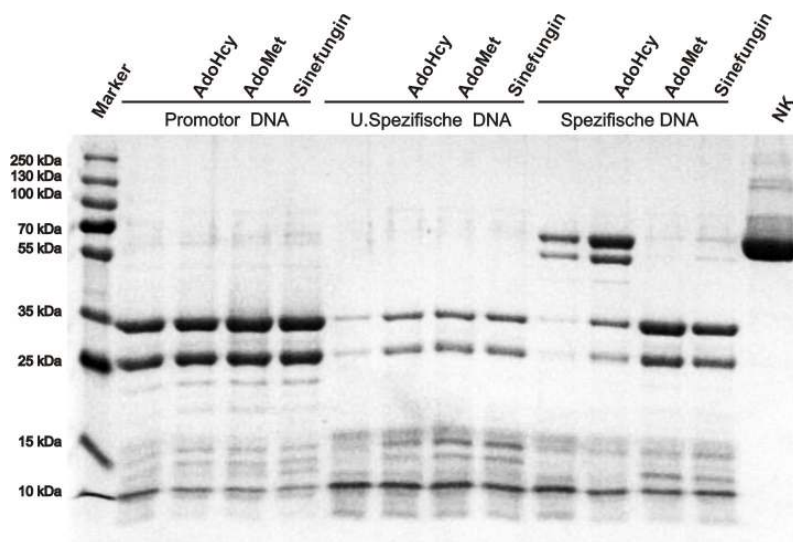


Abbildung 28: Proteolytische Spaltung von M.EcoRII in Abhängigkeit von verschiedenen DNAs und Kofaktoren. Für die Experimente wurden jeweils 18 µg M.EcoRII mit 0,1µg Trypsin in 100 mM HEPES pH 8,0 Puffer für drei Stunden bei 37°C verdaut. Die Ansätze wurden mit den entsprechenden Kofaktoren vor der Zugabe von Trypsin für 30 Minuten vorinkubiert. Die Kofaktoren AdoHcy, AdoMet und Sinefungin wurden jeweils in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Proben sind anschließend auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie sichtbar gemacht worden. NK bezeichnet jeweils das unverdaute Protein. Als Marker wurde der PageRuler™ Plus (Fermentas) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Identifizierung der tryptischen Peptide mittels Massenspektrometrie und Western-Blot

Für die Identifikation der durch proteolytische Spaltung entstandenen 35 kD und 25 kD großen Fragmente wurden die Banden aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, aufbereitet und erneut mit Trypsin in kurze Peptide verdaut. Mittels Massenspektrometrie wurden diese Peptide analysiert und die theoretischen Massen mit den gemessenen Daten verglichen. Bei dieser Analyse konnte die größere der beiden Banden eindeutig als der C-terminale Bereich von M.EcoRII identifiziert werden: Die theoretische Masse dieses Fragmentes beträgt 30 kD und enthält 249 C-terminale Aminosäuren (Aminosäuren 263-512). Das erste identifizierte C-terminale Peptid (249AKKPAIFVLENVKNLK265) befindet sich direkt vor einer Trypsin-Spaltstelle und kann somit als ursprünglicher Spaltort vermutet werden. Die 25 kD große Bande konnte mit dieser Methode nicht eindeutig bestimmt werden, da bei der Messung Fragmente des gesamten Proteins gefunden wurden. Um diese Bande dennoch zuordnen zu können, haben wir einen Western-Blot durchgeführt. Dabei verwendeten wir einen Tetra-His Antikörper, der den N-terminalen 6xHis-Tag erkennen sollten. Der Western-Blot zeigte eindeutig, dass die 25 kD große Banden spezifisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 29). Diese etwa 25 kD große Bande ent-

spricht den ersten 214 N-terminalen Aminosäuren. Durch die Kombination dieser beiden Methoden konnten wir die Trypsin-resistenten Fragmente eindeutig bestimmen.

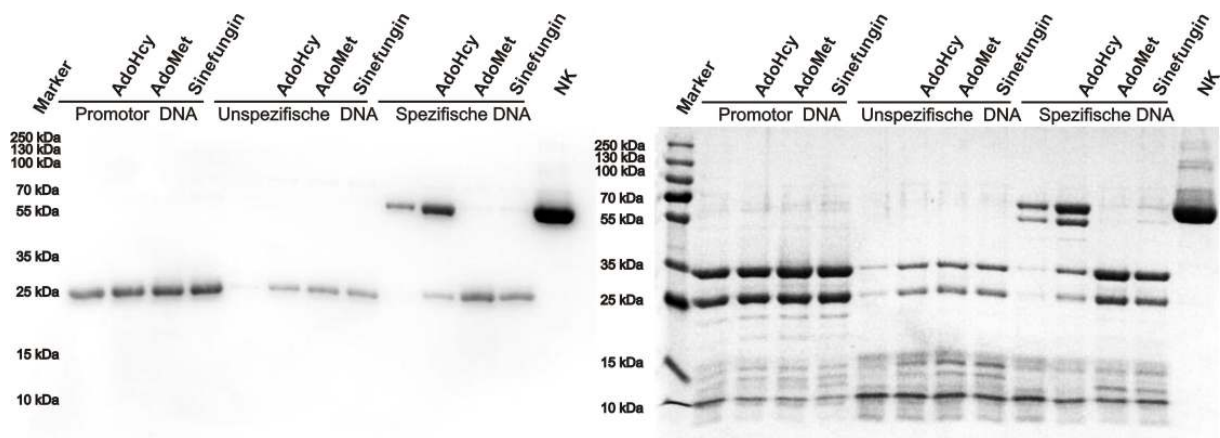


Abbildung 29: Proteolytische Spaltung von M.EcoRII in Abhängigkeit von verschiedenen DNAs und verschiedenen Kofaktoren im Western-Blot. Für die Experimente wurden jeweils 18 µg M.EcoRII mit 0,1 µg Trypsin in 100 mM HEPES pH 8,0 Puffer für drei Stunden bei 37°C verdaut. Die Ansätze wurden mit den entsprechenden Kofaktoren vor der Zugabe von Trypsin für 30 Minuten vorinkubiert. Von den Kofaktoren AdoHcy, AdoMet und Sinefungin wurden jeweils 3 mM eingesetzt. Die Proben sind anschließend auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie (rechts) bzw. durch spezifischen Tetra-His Antikörper (links) sichtbar gemacht worden. NK bezeichnet jeweils das unverdaute Protein. Als Marker wurde der PageRuler™ (Fermentas) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte das 35 kD große Fragment als der C-terminale Bereich von M.EcoRII (Aminosäuren 263-512) identifiziert werden. Das 25 kD große Fragment konnte mittels Western-Blot eindeutig als N-terminale Region von M.EcoRII bestimmt werden (Aminosäuren 1-214).

Kristallisation von M.EcoRII

Da die 3D-Struktur von M.EcoRII nicht bekannt ist, haben wir versucht mit kristallographischen Methoden die Struktur zu lösen. Die Methyltransferase EcoRII besitzt in einigen Bereichen ausgeprägte Homologien zu bereits kristallisierten DNA-Methyltransferasen. Ihre ungewöhnliche Größe und ihre zusätzliche N-terminale Domäne machen M.EcoRII besonders interessant.

Um die vorhandene Proteinmenge möglichst effizient einzusetzen, haben wir uns entschlossen, die "Dampfdiffusionsmethode" in sitzenden Tropfen durchzuführen. Diese Methode ermöglichte uns die Verwendung eines Pipettier-Roboters mit 96

Well-Platten. Der Vorteil der robotergestützten Arbeit ist dabei die Möglichkeit des Ansetzens vieler Kristallisationsproben in kurzer Zeit und mit hoher Präzision. Bei zahlreichen Versuchen M.EcoRII allein zu kristallisieren, haben wir verschiedene Kristallisations-„Screens“ unterschiedlicher Hersteller ohne Erfolg getestet. Als nächste Strategie kombinierten wir unterschiedliche Additive wie AdoMet und AdoHcy mit verschiedenen DNA-Konstrukten, die entweder die Erkennungssequenz oder den Promotorbereich enthielten. Diese Strategie führte ebenfalls zu keiner Kristallbildung.

Daraufhin entschlossen wir uns eine DNA zu verwenden, die einen hemi-methylierten Erkennungsort enthält, um somit die Bindung des Enzyms an einen bestimmten DNA-Strang erzwingen zu können. Diese Strategie blieb vorerst im Tris-HCl Puffer wirkungslos. Bei der Wiederholung aller Experimente in einem HEPES-Probenpuffer bildeten sich die ersten Protein-Kristalle. Die Kristalle bildeten sich innerhalb von drei Tagen bei 18°C in Ansätzen, die M.EcoRII, AdoHcy und hemi-methylierte 13 bp lange DNA enthielten (Abb. 30). Bei dem Versuch diese Kristalle im Synchrotron zu messen, stellte sich heraus, dass die Auflösung nur ca. 9 Å betrug, was keine weitere Analyse erlaubte (Abb. 30). Versuche durch Additive und verschiedene Optimierungsmethoden, wie das „crystal annealing“ und „crystal dehydration“ [95], das Auflösungsvermögen dieser Kristalle zu verbessern, waren leider bisher nicht erfolgreich.

Die Versuche M.EcoRII zu kristallisieren führten zu ersten streuenden Kristallen, deren Auflösung jedoch für eine Lösung der Struktur nicht ausreicht.

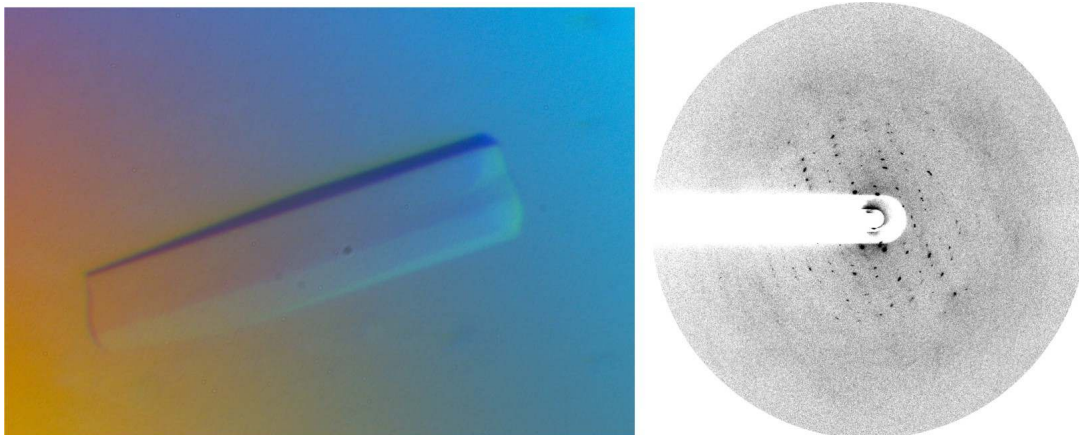


Abbildung 30: M.EcoRII-Kristalle in Anwesenheit von hemi-methylierter DNA und AdoHcy. Die Abbildung links zeigt ein Kristall in einem Kristallisationstropfen, die Abbildung rechts zeigt die Diffraction eines der M.EcoRII-Kristalle.

4 Diskussion

Diese Arbeit referiert die Untersuchung der Restriktionsendonuklease EcoRII und der dazugehörigen Methyltransferase M.EcoRII. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Autoinhibition durch zahlreiche biochemische Experimente von EcoRII gewonnen werden. Außerdem ist es gelungen eine hochauflösende EcoRII-WT Kristallstruktur mit gebundenen Magnesiumionen zu lösen, die neue Einblicke in den Spaltmechanismus erlaubt. Basierend auf dieser Kristallstruktur konnten, mit Hilfe bioinformatischer Methoden, verschiedene Enzym-DNA-Modelle erstellt werden. Diese zeigen das Enzym mit DNA im autoinhibierten und katalytisch aktiven Zustand. Eines dieser Modelle ermöglichte die Vorhersage eines neuen DNA-Bindungsmotives, welches anschließend mit Hilfe von molekularbiologischen Experimenten untersucht wurde. Bei der Untersuchung der Methyltransferase M.EcoRII konnten neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise der transkriptionellen Regulation gewonnen werden. Zusätzlich konnten die an der DNA-Bindung beteiligten Domänen in Abhängigkeit von Kofaktoren bestimmt werden. Außerdem konnten vielversprechende Kristallisationsexperimente mit M.EcoRII durchgeführt werden, die zu ersten streuenden Kristallen führten.

4.1 Molekulare Charakterisierung der minimalen regulatorischen Einheiten von EcoRII, die für die Autoinhibition verantwortlich sind

EcoRII wurde durch zahlreiche Untersuchungen eingehend beschrieben. Dabei stellte sich heraus, dass zwei funktionell unterschiedliche Domänen, wie die N- und C-terminale Domäne von EcoRII, nur bei wenigen Typ II-Restriktionsenzymen vorhanden sind [96]. Der modulare Aufbau des Enzyms führte zur Formulierung eines auf Autoinhibition basierten Regulationsmechanismus [46,48]. EcoRII war damit das erste Typ II-Restriktionsenzym mit einer Regulation durch Autoinhibition. Mittlerweile sind andere Restriktionsendonukleasen beschrieben worden, die ebenfalls über Autoinhibition reguliert werden [97,98]. Bei der Untersuchung des Autoinhibitionsmechanismus von EcoRII ist es uns gelungen, die minimale regulatorische Region in EcoRII zu bestimmen und zu charakterisieren [99]. Diese Region befindet sich im N-terminalen Bereich des Enzyms und wird von den Sekundärstrukturen β -Strang B1 und α -Helix H2 gebildet. Die N-terminale Domäne blockiert dabei sterisch das katalytische Zentrum und reguliert damit die Spaltung der DNA. Der Verlust einer dieser

Sekundärstrukturen bewirkt eine vollständige Aufhebung der Autoinhibition, die sich durch eine vollständige Spaltung von T3 Phagen-DNA beobachten lässt. Im Gegensatz dazu ist das EcoRII-WT Enzym nicht in der Lage, T3 Phagen-DNA zu spalten, da diese nur drei EcoRII-Erkennungsorte enthält, die weit voneinander entfernt sind [40,100,101,102,103].

Unsere Untersuchungen bestätigen den für EcoRII vorgeschlagenen Autoinhibitionsmechanismus [48] und erklären auf molekularer Ebene welche strukturellen Elemente diesem zugrunde liegen [99].

Die Regulation von enzymatischen Prozessen gehört zu den wichtigsten zellulären Aufgaben, die eine Zelle bewerkstelligen muss. Dabei ist die Regulation durch Autoinhibition ein sehr präziser und deshalb auch weitverbreiteter Regulationsmechanismus bei diversen Proteinen verschiedener Organismen, z.B. bei dem menschlichen Proto-Onkogen Vav, der Archaea Hel308 Reparatur-Helikase und vielen anderen Proteinen bei verschiedenen Spezies [104,105,106,107,108]. Mittlerweile ist es gelungen, auch andere Restriktionsendonukleasen zu charakterisieren, die über Autoinhibition reguliert werden. Zu diesen Endonukleasen zählt Bse634I, das als Homotetramer vorliegt und aus zwei Dimeren gebildet wird. Die Regulation der Autoinhibition wird dabei durch intermolekulare Signaltransduktion zwischen den beiden Dimeren vermittelt [97]. Ein weiteres Beispiel für ein autoinhibiertes Restriktionsenzym ist Bfil, ein Mg^{2+} -unabhängiges Enzym [98]. Dabei verfügt Bfil über eine EcoRII-ähnliche Struktur, die der N-terminalen Domäne von EcoRII entspricht. Die Autoinhibition wird bei Bfil durch den Linker zwischen der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-170) und der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 199-358) reguliert. Dieser Linker bindet in Abwesenheit des Substrates an den für die DNA-Bindung verantwortlichen Bereich und imitiert so die DNA, ähnlich dem Ocr Antirestriktionsprotein, das in seiner räumlichen Struktur DNA in der B-Form nachahmt [109].

Wie die aufgeführten Beispiele zeigen, verfügen die meisten Autoinhibitionsmodule über intramolekulare Interaktionspunkte zwischen der inhibitorischen und der funktionellen Domäne [107]. Die Beobachtung, dass die Zugabe von EcoRII-N *in trans* die Spaltung durch EcoRII-C inhibierte, die Spaltung durch das Isoschizomer MvaI aber nicht beeinflusste, ließ eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen der N- und C-terminalen EcoRII-Domäne vermuten. Die Beobachtung, dass bei diesen Titrationsexperimenten ein molarer Überschuss der N-terminalen Domäne zugege-

ben werden musste um eine Inhibition von EcoRII-C zu erreichen, beruht vermutlich auf dem Umstand, dass die Domänen nicht physisch verbunden sind. Die Experimente mit dem Isoschizomer MvaI und EcoRII-N zeigten dagegen, dass EcoRII-N keine Inhibition von MvaI verursacht. Die höchste EcoRII-N Konzentration zeigte nur eine sehr geringe Hemmung der MvaI-Spaltung. Diese Hemmung wird vermutlich durch Konkurrenz von MvaI und EcoRII-N um den DNA-Erkennungsort oder durch unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht, nicht aber durch spezifische Interaktion.

Die Experimente, bei denen einzelne Aminosäuren der Interdomänen-Kontaktstellen substituiert wurden, zeigten eine teilweise Aufhebung der Autoinhibition. Die Mutantenproteine E145A, S173A und E351A zeigten eindeutig, dass Substitutionen von Aminosäuren innerhalb der Interdomänen-Kontaktstellen zu einer partiellen Aufhebung der Autoinhibition führten, was durch eine partielle T3 Phagen-DNA Spaltung durch diese Mutantenzymen sichtbar wurde. Die unvollständige Aufhebung der Autoinhibition wurde vermutlich durch eine partielle Störung der Interdomänen-Kontaktstellen hervorgerufen, bei der unter anderem die Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrücken gestört wurde. Die Aufhebung der Repression im Fall des Mutantenzymen EcoRII-E351A kann interessanterweise nicht durch eine verhinderte Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Glu351 und Ala27 erklärt werden, da die Wasserstoffbrücken zwischen diesen Aminosäuren am Aminosäurerückgrat ausgebildet werden. Der beobachtete Effekt könnte deshalb vielmehr über die Störung eines erweiterten Wassermolekülnetzwerks zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Glu351, Arg24 und Gly158 erklärt werden [110]. Die Kombination verschiedener Mutationen (E145A/S173A, E145A/E351A, E145A/S354A, S173A/E351A und S173A/S354A) hatte interessanterweise keinen verstärkenden Effekt auf die Aufhebung der Autoinhibition. Die Ursache für diese Beobachtung liegt vermutlich im modularen Aufbau der Interdomänen-Kontaktstellen. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Untersuchung der Interaktion zwischen der TEM1- β -Laktamase und dem β -Laktamase-Inhibitor mittels Protein-Ballungsanalyse beobachtet werden, bei der die Protein-Protein-Interaktionsstellen mit Hilfe von biophysikalischen und bioinformatischen Methoden detailliert untersucht wurde. Dabei ist festgestellt worden, dass Einzelmutationen innerhalb desselben Interaktions-Ballungszentrums nicht zwangsläufig additiv sind [111].

Um die für die Autoinhibition notwendige Region innerhalb von EcoRII genauer einzugrenzen, verwendeten wir synthetische Peptide. Diese Peptide entsprachen Bereichen der N-terminalen Domäne und wurden analog zu den Versuchen mit EcoRII-C und -N durch Zugabe *in trans* auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Um mögliche autoinhibitorische Elemente zu identifizieren, haben wir die gesamte N-terminale Domäne nach Sekundärstrukturmotiven, die mit der C-terminalen Domäne interagieren, durchsucht und dabei zwei jeweils 30 Aminosäuren lange Peptide ausgewählt. Peptid 1 präsentierte die Aminosäuresequenz 4 SVFHNWLLEIACE-NYFVYIKRLSANDTGAT ${}_{33}$ und Peptid 2 die Sequenz 144 EEDVIETAIGEVIP-GALISGPAGQ-ILGGLS ${}_{173}$. Diese löslichen Peptide enthalten die wichtigsten Interaktionspunkte zwischen der N- und C-terminalen Domäne. Peptid 1 enthält die Aminosäuren Ser26 und Ala27, die mit Glu351 interagieren. Peptid 2 hingegen beinhaltet die Aminosäuren Glu145 und Ser173, die mit Arg330 und Arg262 wechselwirken. Es zeigte sich, dass durch die Zugabe von Peptid 1 *in trans* die Spaltung durch EcoRII-C vollständig inhibiert werden konnte. Bei Kontrollexperimenten mit Peptid 1 und dem Isoschizomer Mval konnte hingegen keinerlei Inhibition festgestellt werden. Das Kontrollpeptid, das aus einer zufälligen Aminosäuresequenz (AEYPAHG-TRLVKRLQTFVPNKEILCSMDGS) besteht, zeigte ebenfalls keine inhibitorische Wirkung auf die durch EcoRII-C vermittelte DNA-Spaltung. Obwohl die beiden Peptide 1 und 2 Bereiche der N-terminalen inhibitorischen Domäne repräsentieren, hatte nur Peptid 1 einen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung. Peptid 2 enthält also entweder keine für die Autoinhibition essentielle Region oder es verfügt in Lösung nicht über eine korrekte Sekundärstruktur. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die durch Peptid 1 repräsentierten Aminosäuren 4-33 der N-terminalen Domäne das autoinhibitorische Motiv enthalten.

Um dieses Motiv genauer zu lokalisieren haben wir die in Peptid 1 enthaltenen Sekundärstrukturen α -Helix H1, β -Strang B1 und α -Helix H2 sukzessiv deletiert. Durch Spaltexperimente mit den entsprechenden Mutantenzymen EcoRII- Δ H1, EcoRII- Δ B1 und EcoRII- Δ H2 konnten wir die minimale regulatorische Region identifizieren. Die Deletion sehr kurzer Bereiche innerhalb der N-terminalen Domäne führte zu einer vollständigen Aufhebung der Autoinhibition. Wir konnten zeigen, dass die Mutante EcoRII- Δ B1, welche eine Deletion zwischen den Aminosäuren 18-24 aufweist, sowie EcoRII- Δ H2, der die Aminosäuren 26-30 fehlen, vollständig dereprimiert sind. Diese regulatorischen Elemente stellen demnach die minimale regulatorische Einheit

dar, die für den Autoinhibitionsmechanismus in EcoRII verantwortlich ist. Durch die Deletion der α -Helix H1 konnte interessanterweise die Autoinhibition nur partiell aufgehoben werden. Die beiden Deletionsmutanten EcoRII- Δ B1 und EcoRII- Δ H2 zeigten hingegen eine vollständige Spaltung von T3 Phagen-DNA und waren wie EcoRII-C vollständig dereprimiert (Abb. 31). Aus der EcoRII-Kristallstruktur geht hervor, dass die Aminosäuren Ser26 und Ala27, die in der α -Helix H2 der N-terminalen Domäne lokalisiert sind, mit der Aminosäure Glu351 der C-terminalen Domäne Wasserstoffbrücken ausbilden [48]. Sie sind damit maßgeblich an der Bildung der minimalen inhibitorischen Einheit beteiligt. Die Substitution von Glutaminsäure durch Alanin an der Position 351 zeigte nur eine partielle Aufhebung der Autoinhibition und lässt vermuten, dass für die Funktion der Autoinhibition ein Zusammenspiel verschiedener Aminosäuren in einem Interaktionsnetzwerk notwendig ist.

Die EcoRII-Kristallstruktur zeigt, dass der β -Strang B1 und die α -Helix H2 mit der an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäure Tyr41 interagieren [47]. Dabei formen die Aminosäuren Tyr21 und Lys23 im β -Strang B1 und Asp29 in der α -Helix H2 Wasserstoffbrücken mit Tyr41 aus [54]. Bei der Betrachtung der neuen Ko-Kristallstruktur von EcoRII-N mit DNA wird deutlich, dass die DNA über den N-Arm (Aminosäuren 27-42) und den C-Arm (Aminosäuren 78-101) im N-Terminus von EcoRII gebunden wird. Dabei ist β -Strang B1 und α -Helix H2 im N-Arm und die β -Stränge B4 und B5 im C-Arm für die DNA-Bindung verantwortlich. Diese Ko-Kristallstruktur enthält ebenfalls die von uns für EcoRII-R88A beschriebenen Wasserstoffbrücken zwischen Tyr21, Asp29 und Tyr41, die vermutlich für die Ausbildung der Autoinhibition notwendig sind [54,99]. Die Autoinhibition bei EcoRII wird vermutlich durch den Prozess der DNA-Bindung reguliert. Dabei könnten die Aminosäuren Tyr21, Asp29 und Tyr41 ein Interaktionsnetzwerk ausbilden, das als eine Art Schlüsselposition der Autoinhibition fungiert. Die Bindung der Effektor-DNA würde dabei zu einer Konformationsänderung innerhalb dieser inhibitorischen Einheit führen [99]. Die Betrachtung der Ko-Kristallstruktur von EcoRII-N ermöglicht uns einen Einblick in den DNA-Bindungsprozess [54]. Die durch DNA-Bindung verursachte Konformationsänderung der inhibitorischen Einheit führt interessanterweise nicht zu einer Störung der Interaktion zwischen Tyr21, Asp29 und Tyr41 sondern ermöglicht die Bildung einer zusätzlichen Interaktion [54]. Durch die Bindung von DNA kommen Asp28 und Gln37 in räumliche Nähe, wobei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, die eine Konformationsänderung der inhibitorischen Einheit bewirken. Diese Konformations-

änderung führt letztendlich auch zu einer Störung der Interaktion zwischen Gln351 und Ala27 und damit vermutlich zur Aufhebung der Autoinhibition [99].

Diese Hypothese ist ebenfalls mit unserer neuen EcoRII-WT Struktur (diese Arbeit) konform. Interessanterweise führt die Deletion des β -Stranges B1 zu einer Aufhebung der Autoinhibition, obwohl keine der dort vertretenen Aminosäuren 18-24 direkt an der DNA-Bindung beteiligt ist, sondern lediglich mit Tyr41 interagiert. Diese Beobachtung verstärkt unsere Vermutung, dass durch die Deletion des β -Stranges B1 und der α -Helix H2 der Autoinhibitionsmechanismus selektiv aufgehoben werden kann ohne die DNA-Bindung vollständig zu inhibieren. Dafür spricht auch der K_D -Wert des Mutantenzym EcoRII- Δ H2, der bei K_D 10,5 nM liegt und nur unwesentlich schlechter als der K_D -Wert des WT-Enzyms (K_D 1nM) ist [46].

Durch unsere Experimente konnten wir den für EcoRII vorgeschlagenen Autoinhibitionsmechanismus bestätigen. Es war uns ebenfalls möglich, die inhibitorische Domäne mit Hilfe von synthetischen Peptiden zu bestimmen und den Autoinhibitionsmechanismus mit Hilfe von Deletionsmutanten zu charakterisieren. Das Vorhandensein der autoinhibitorischen Domäne ermöglicht dem Enzym eine exakte Regulation der Spaltung, die eine Interaktion mit zwei Erkennungsorten voraussetzt und damit einen zusätzlichen Sicherheitsmechanismus darstellt, der den Organismus vor ungewollter Spaltung schützt. Dieser Sicherheitsmechanismus schützt einerseits das bakterielle Genom vor ungewollter Restriktion des eigenen Erbmateri als und verringert andererseits die DNA-Spalteffizienz gegenüber eindringender DNA, indem es seine eigene Substratauswahl einschränkt.

Die Fähigkeit, zwei DNA-Moleküle binden zu können, ist bei Enzymen, die an Rekombinationsereignissen beteiligt sind, weit verbreitet. In früheren Arbeiten ist bereits gezeigt worden, dass EcoRII Ähnlichkeiten zu Integrasen aufweist. Die Tatsache, dass katalytisch relevante Aminosäuren bei beiden Enzymen konserviert vorliegen, lässt vermuten, dass EcoRII eine evolutive Zwischenstufe zwischen Integrasen und Restriktionsenzymen darstellen könnte [42,112]. Diese Ähnlichkeit bestätigt den „egoistische Charakter“ von Restriktionsendonukleasen und zeigt eine evolutive Nähe von EcoRII zu transponierbaren Elementen auf.

In einer anderen Arbeit ist gezeigt worden, dass die N-terminale EcoRII-Domäne mit der DNA-bindenden Domäne (B3) des pflanzlichen Transkriptionsfaktors RAV1 strukturell homolog ist: Diese B3 Domäne bindet DNA mit der Sequenz 5'CACCTG, die

mit der EcoRII-Erkennungssequenz (5'CCA/TGG) überlappt (überlappende Sequenz ist unterstrichen) [55]. Die strukturellen Übereinstimmungen und die Fähigkeit beider Proteine DNA sequenzspezifisch binden zu können, lassen uns vermuten, dass die von uns für EcoRII beschriebene autoinhibitorische Regulation auch bei RAV1 und ähnlichen Transkriptionsfaktoren vorhanden sein könnte. Der Austausch dieser Domänen zwischen den Spezies bestätigt einen rege stattfindenden beidseitigen horizontalen Gentransfer, der die Verbreitung dieser Domänen erklärt [113].

4.2 Die Röntgenstruktur des nativen EcoRII-Enzyms bei einer Auflösung von 1.9 Å offenbarte eine neue Mg²⁺-Bindungstasche und Wechselwirkungen des Enzyms mit der „kleinen DNA-Furche“

EcoRII gehört zu den Restriktionsendonukleasen des Typs IIE und muss für eine effiziente DNA-Spaltung mit mindestens zwei DNA-Molekülen gleichzeitig interagieren [40,43,49,51]. Proteolytische Untersuchungen haben gezeigt, dass EcoRII aus zwei Domänen besteht, die jeweils unabhängig voneinander spezifisch DNA binden können. Die C-terminale Region (EcoRII-C) besitzt die katalytische Aktivität, wohingegen die N-terminale Region (EcoRII-N) nur DNA binden kann [46]. Die Kristallstruktur der EcoRII-R88A-Mutante ermöglichte einen ersten Einblick in die strukturellen Besonderheiten dieser Restriktionsendonuklease und deren ungewöhnliche Domänenkonstellation [48,114]. Dabei wurde klar, dass EcoRII als Homodimer vorliegt. Die antiparallel angeordneten Monomere bestehen jeweils aus zwei annähernd gleich großen Domänen, die durch eine flexible Linker-Region miteinander verbunden sind. Die N-terminale Effektor-Domäne offenbarte ein bis dahin unbekanntes Strukturelement mit einer ausgeprägten DNA-bindenden Tasche. Die C-terminale Domäne zeigte die für Restriktionsendonukleasen typische Faltung mit dem katalytischen PD-(D/E)XK Motiv [20]. Die Kristallstruktur von EcoRII offenbarte auch, dass die beiden N-terminalen Domänen das katalytische Zentrum verschließen. Diese Beobachtung führte zusammen mit proteolytischen Experimenten zur Formulierung der Hypothese, dass die enzymatische Aktivität von EcoRII über einen Autoinhibitionsmechanismus reguliert wird [46,48]. Uns ist es gelungen diesen Mechanismus zu bestätigen und die für die Autoinhibition verantwortliche Region genau zu benennen [99].

Um Details der EcoRII-Proteinstruktur besser verstehen zu können, haben wir eine hoch aufgelöste EcoRII-WT Struktur erstellt und mit der EcoRII-R88A Struktur vergli-

chen. Die Tatsache, dass die R88A-Mutante [48] in Spaltexperimenten DNA sehr effizient spalten kann, lässt vermuten, dass die gelöste 3-D Proteinstruktur (PDB Eintrag 1NA6) dieser Mutante keine gestörte Konformation besitzt. Die strukturellen Unterschiede zwischen EcoRII-WT und EcoRII-R88A sollten demnach nur gering sein. Der Vergleich der EcoRII-R88A Struktur mit der neuen EcoRII-WT Struktur zeigt viele Übereinstimmungen, aber auch einige Unterschiede. Die antiparallele Anordnung der beiden Monomere ist in beiden Strukturen gleichermaßen ausgeprägt. Die für Restriktionsendonukleasen charakteristischen Sekundärstrukturen im katalytischen Zentrum, geformt von den β -Strängen B9 - B13 sowie den α -Helices H11 und H14, sind ebenfalls in beiden Strukturen vorhanden [20,48]. Die Unterschiede liegen vielmehr in der Anordnung der Monomere. Das Dimer des Mutantenzym EcoRII R88A ist im Vergleich zu dem WT-Dimer deutlich „gestaucht“. Die Berechnung der strukturellen Standardabweichung ergab eine allgemeine Abweichung von ca. 4 Å zwischen den beiden Dimeren. Die Berechnung der Abweichung zwischen den einzelnen Monomeren hingegen zeigte nur einen geringen Unterschied zwischen den beiden Strukturen (ca. 1 Å). Die strukturellen Unterschiede liegen somit an der Anordnung der Monomere zueinander. Die veränderte Konformation des R88A-Dimers könnte ein Artefakt des Kristallisationsprozesses sein. Bei der Betrachtung der symmetrischen Einheiten im Kristall der R88A-Struktur sieht man deutlich, dass die Position der R88A-Mutation an der Schnittstelle zwischen den einzelnen Dimeren liegt. Die Mutation von Arginin zu Alanin an der Position 88 ermöglicht dadurch eine andere Packung der Dimere, da die Seitenketten der Arginine nicht mehr vorhanden sind. Diese zum WT-Enzym unterschiedliche Packung führt wahrscheinlich zu einer Stauchung des Dimers und letztlich zu einer anderen Konformation.

Die durch uns identifizierte Mg^{2+} -Bindungstasche könnte ebenfalls an der unterschiedlichen Ausbildung der Dimerpackung beteiligt sein. Da aber die neu beschriebene Mg^{2+} -Bindungstasche nicht im Bereich der Dimerkontaktstellen lokalisiert ist, ist die veränderte Dimerpackung wahrscheinlich nicht auf das Mg^{2+} zurückzuführen.

Diese Bindungstasche ist sehr interessant, da sie zum ersten Mal EcoRII mit dem natürlichen Kofaktor Mg^{2+} zeigt (Abb. 31). Die durch Ala338 und Ile341 gebildete Bindungstasche befindet sich in direkter Nähe zu den Aminosäuren Lys328, Asp329 und Arg330, welche wichtige Funktionen in der durch EcoRII-C vermittelten DNA-Bindung und -Spaltung erfüllen [91].

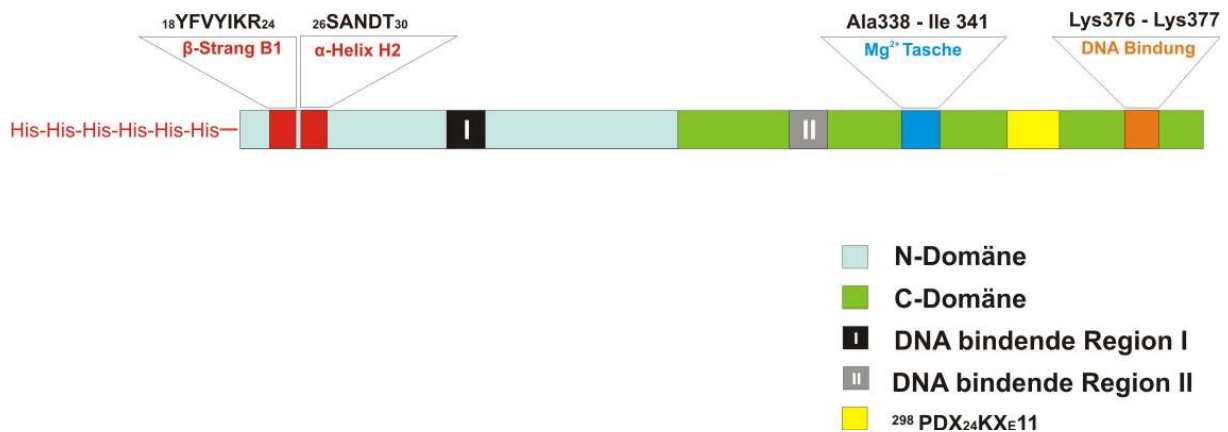


Abbildung 31: Übersichtsdarstellung über die im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über neue EcoRII-Strukturmodule. Rot dargestellt sind die für die Autoinhibition verantwortlichen Sekundärstrukturen H2 und B1. Die Mg^{2+} -Bindungstasche ist blau, die durch Computermodellvorhersage und durch biochemische Untersuchung bestätigte neue DNA-Bindungsregion orange dargestellt. Die N-terminale Domäne ist hellblau, die C-terminale katalytische Domäne grün abgebildet. Das konservierte katalytische Motiv ist gelb, die bereits zuvor beschriebenen DNA bindenden Regionen (I) und (II) sind schwarz und grau dargestellt.

Es ist gezeigt worden, dass die Substitution von Lys328 und Arg330 durch Alanin zu einer fast vollständigen Hemmung der DNA-Bindung und -Spaltung in EcoRII-C führt [91]. Die Mutation der Position Asp329 führte im Gegensatz dazu zu einem fast vollständigen Verlust der Spaltaktivität, wobei die DNA-Bindung nur 10-fach verschlechtert wurde [91]. Der Grund für diese veränderte DNA-Bindung und -Spaltung dieser Mutantenzymen war bis jetzt unklar. Interessanterweise sind die Aminosäuren Lys328, Asp329 und Arg330 bei EcoRII homolog zu den Positionen Arg191, Asp193 und Arg194 in NgoMIV, wobei diese Aminosäuren bei NgoMIV nur an der DNA-Bindung beteiligt sind [91,93]. Die Rolle dieser Positionen ist bei EcoRII bestätigt worden, als die Ko-Kristallstrukturen von EcoRII-N und EcoRII-C mit DNA gelöst wurden [54]. Dabei zeigte sich, dass Lys328, Asp329 und Arg330 eines Monomers jeweils eine Hälfte der CCA/TGG Erkennungssequenz binden. Die durch Ala338 und Ile341 gebildete Mg^{2+} -Bindungstasche befindet sich somit in Nähe der DNA-Bindungsregion der C-terminalen Domäne. Die von uns beschriebene Ionen-Bindungstasche könnte somit eine Rolle bei der DNA-Erkennung, wie bei der Restriktionsendonuklease NotI, spielen. Bei NotI ist eine neuartige Mg^{2+} -Bindungstasche beschrieben wurde, die am Prozess der DNA-Erkennung maßgeblich beteiligt ist [115].

Durch die große Entfernung von rund 14 Å zwischen dem von uns beschriebenen Magnesiumion in der Bindungstasche und der DNA ist eine direkte Beteiligung der

Mg²⁺-Bindungstasche an der DNA-Erkennung bei EcoRII jedoch unwahrscheinlich. Interessanterweise enthält die Ko-Kristallstruktur von EcoRII-C trotz der Anwesenheit von zweiwertigen Ionen im Kristallisationsansatz keine gebundenen zweiwertigen Ionen, obwohl diese für die EcoRII-C vermittelte DNA-Bindung und -Spaltung essentiell sind. Dies lässt vermuten, dass die Ionen nachträglich aus dem Kristall diffundiert sind.

Die Untersuchung der NgoMIV Struktur zeigte, dass die DNA bei NgoMIV über die Aminosäuren Arg191, Asp193 und Arg194 gebunden wird. Diese Aminosäuren sind zu Lys328, Asp329 und Arg330 in EcoRII homolog. Die Spaltung erfolgt bei NgoMIV im katalytischen Zentrum, das durch die Aminosäuren Gln70, Asp140, Lys187 und Glu201 gebildet wird [91]. Das katalytische Zentrum von EcoRII wird von den Aminosäuren Glu271, Asp299, Lys324 und Glu337 gebildet, die zu den Positionen Gln70, Asp140, Lys187 und Glu201 homolog sind. Die Überlagerung der katalytischen Zentren von EcoRII und NgoMIV zeigte, dass die Entfernung zwischen dem von uns gefundenen Magnesiumion, in der durch Ala338 und Ile341 gebildeten Bindungstasche und dem durch die Aminosäuren Glu271, Asp299, Lys324 und Glu337 gebildetem katalytischen Zentrum mit gebundenem Magnesiumionen rund 10 Å beträgt. Die räumliche Entfernung zwischen der Mg²⁺-Bindungstasche und dem katalytischen Zentrum lässt vermuten, dass die von uns in Abwesenheit von DNA gefundene Mg²⁺-Bindungstasche eine Art „Depot“ für Mg²⁺ darstellt, aus welchem Ionen nach Bedarf in die katalytische Bindungstasche transportiert werden könnten.

Kürzlich durchgeführte kinetische Untersuchungen an zahlreichen Typ II-Endonukleasen der EcoRI-Familie (zu denen auch EcoRII zählt) zeigten, dass für eine DNA-Bindung ein einzelnes Magnesiumion ausreichend ist. Im Gegensatz dazu sind zwei Magnesiumionen für die Spaltung der DNA notwendig [92]. Diese kinetischen Untersuchungen verdeutlichen, dass die Anzahl der an DNA-Bindung und -Spaltung beteiligten zweiwertigen Ionen vom Enzym und von dessen Zustand abhängig sind. So könnte die in EcoRII gefundene Mg²⁺-Bindungstasche einen Zustand darstellen, in dem das Enzym in einer inaktiven Konformation vorliegt, bei der durch die Bindung von DNA in einen aktiven Zustand gewechselt werden kann. Diese Vermutung wird dabei von den Ergebnissen der Untersuchung an PvuII gestützt, bei dem auch eine zusätzliche Mg²⁺-Bindungstasche gefunden wurde. Die Mutation von Aminosäuren innerhalb dieser Bindungstasche führte dabei zu einer Verlangsamung der Spaltung. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass das Magnesiumion an einer

Position zwischengelagert wird und im Verlauf der Spaltung in das katalytische Zentrum „rutscht“ [116].

Die Erstellung eines Modells von EcoRII-C mit DNA im katalytisch aktiven Zustand erfolgte durch uns vor der Publikation der EcoRII-C Ko-Kristallstruktur und war durch hohe Homologien zwischen den Restriktionsendonuklease Ecl18KI und EcoRII-C möglich. Unser Modell zeigte dabei die an der Stabilisierung der „herausgeflippten“ Basen beteiligten Aminosäuren Tyr226 und Arg222, die zu den Aminosäuren Phe67 und Arg57 in Ecl18KI homolog sind [94]. Der Vergleich unseres Modells mit der tatsächlichen Ko-Kristallstruktur bestätigte unsere Vorgehensweise und zeigte die gleichen Positionen. Die Unterschiede zwischen dem Modell und der Ko-Kristallstruktur beruhen auf den Konformationsänderungen, die aufgrund der DNA-Bindung stattgefunden haben. Unser Modell war zu dem Zeitpunkt der Herstellung ein robustes Arbeitsmodell, welches aber letztendlich von der eigentlichen Ko-Kristallstruktur in einigen Bereichen abwich.

Das EcoRII-Modell im katalytisch inaktiven Zustand, das auf der Modellierung der N-terminalen EcoRII-Struktur (PDB Eintrag 3HQF) mit unserer EcoRII-WT Struktur beruht, zeigt die simultane Bindung von zwei DNA-Molekülen durch beide N-Termini. Dieser Zustand könnte die EcoRII-Konformation simulieren, die bei der Ausbildung der DNA-Schlaufen möglich ist [44,50,117]. Dabei würden die beiden N-Termini jeweils einen Erkennungsort binden und den dazwischen liegenden Bereich durch die Ausbildung einer Schlaufe überbrücken. Das katalytische Zentrum würde in diesem Zustand noch durch die beiden N-Termini blockiert werden. Dieser Zustand ist vermutlich nur sehr selten und kurzlebig, da DNA mit zwei Erkennungsorten bereits gespalten werden kann. In FRET-Experimenten wurde nachgewiesen, dass die an der DNA-Schlaufenausbildung beteiligten Erkennungsorte im DNA-EcoRII-Komplex in einer Entfernung von $20 \pm 10 \text{ \AA}$ liegen [51]. In unserem Modell befinden sich die beiden DNA-Moleküle in einer Entfernung von ca. 75 \AA . Die durch unser Modell vorgeschlagene gleichzeitige Bindung zweier DNA-Moleküle durch jeweils einen der beiden N-Termini kann somit durchaus kritisch diskutiert werden. Die Bindung einer N-terminalen Domäne an einen Erkennungsort gilt im Gegensatz dazu als sicher [47,54]. Die unterschiedlichen räumlichen Abstände beruhen vermutlich auf der Tatsache, dass es sich bei beiden Modellen um Momentaufnahmen eines dynamischen Prozesses handelt, die jeweils nur eine Molekülpopulation widerspiegeln. Diese Dynamik konnte auch bei verschiedenen AFM-Untersuchungen von EcoRII festgestellt

werden, bei denen unterschiedliche Schlaufenvarianten beobachtet wurden [44,50,117]. Die Tatsache, dass bei den Ko-Kristallstrukturen (PDB Eintrag 3HQF und 3HQG) einzelne Domänen vorliegen, wirft die Frage auf, wie das vollständige Enzym DNA bindet.

Der Vergleich zwischen dem katalytisch inaktiven EcoRII-Modell und der Ko-Kristallstruktur 3HQF offenbarte auf der DNA-Bindungsebene Unterschiede. Es zeigte sich, dass die Betrachtung der kristallisierten Einzeldomäne (PDB Eintrag 3HQF) nur einen unvollständigen Einblick in den DNA-Bindungsprozess erlaubt.

Unser Modell verdeutlicht, dass bei der N-terminal vermittelten DNA-Bindung zwangsläufig Bereiche der C-terminalen Domäne mit der DNA interagieren müssen. Dieser Bereich wird durch die beiden Aminosäuren Lys376 und Lys377 gebildet (Abb. 31). Diese Aminosäuren interagieren außerhalb der Erkennungssequenz über die „kleinen Furche“ mit der DNA. Diese EcoRII-Region ist bei Experimenten mit membrangebundenen Peptiden bereits in früheren Arbeiten aufgefallen. Dabei wurden kurze, die EcoRII-Aminosäuresequenz repräsentierende Peptide auf ihre DNA-Bindung hin untersucht. So konnten zwei DNA-bindende Regionen charakterisiert werden [45].

Da die Mutation der für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäure Tyr41 bereits zu einer vollständigen Aufhebung der DNA-Bindung führt, schlussfolgern wir, dass die durch das Lys376/Lys377 Motiv ermöglichte DNA-Bindung im Anschluss an die durch Tyr41 vermittelte Bindung stattfinden muss [47]. Die Bindung der DNA durch das Lys376/Lys377 Motiv verleiht dem Protein-DNA-Komplex zusätzliche Stabilität. Diese Vermutung konnte durch EMSA-Experimente gestützt werden. Dabei zeigte sich, dass die Substitution der Aminosäuren Lys376 und Lys377 durch Alanin zu einer verschlechterten DNA-Bindung führt. Die durch diese Mutantenzymen geformten Protein-DNA-Komplexe zeigten im Gel ein verändertes Laufverhalten, was auf eine geänderte Konformation des Komplexes schließen lässt.

Die Rolle der „kleinen Furche“ bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung ist für zahlreiche Proteine festgestellt worden. Bei einer vergleichenden Untersuchung wurden zahlreiche Strukturen analysiert und auf gemeinsame DNA-bindende Motive untersucht [118,119]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Proteinen über die „kleine Furche“ der DNA interagiert. Dabei bedienen sich die Proteine der 3-D Struktur der DNA um zusätzliche Spezifität und Stabilität zu erhalten.

Zusätzlich ist festgestellt worden, dass die Aminosäuren Arginin und Lysin besonders häufig in diesen Erkennungsmotiven vertreten und in den Bindungsprozess involviert sind. Die Breite der „kleinen Furche“ dient bei dieser Art von Erkennung und Bindung als maßgebliches Kriterium. Bei EcoRII könnte ein solcher Erkennungsmechanismus die benachbarten Basen der Erkennungssequenz CCA/TGG miteinbeziehen. Dabei würden auch die Basen außerhalb der eigentlichen Erkennungssequenz gebunden werden. Die Erkennungssequenz für EcoRII müsste somit CCA/TGGxx lauten, wobei „x“ die Basen repräsentiert, die die Eigenschaften der „kleinen Furche“ auslesen. Die physiologische Bedeutung dieses Motives bleibt weiter unklar, da das Mutantenenzym mit der Doppelmutation (EcoRII-K376A-K377A) im Vergleich zum Wildtyp über eine unveränderte Spaltaktivität gegenüber pBR322 Plasmid- und T3 Phagen-DNA verfügt (Daten nicht gezeigt). Die Frage, welche Funktion dieses Bindungsmotiv erfüllt, bleibt damit noch offen.

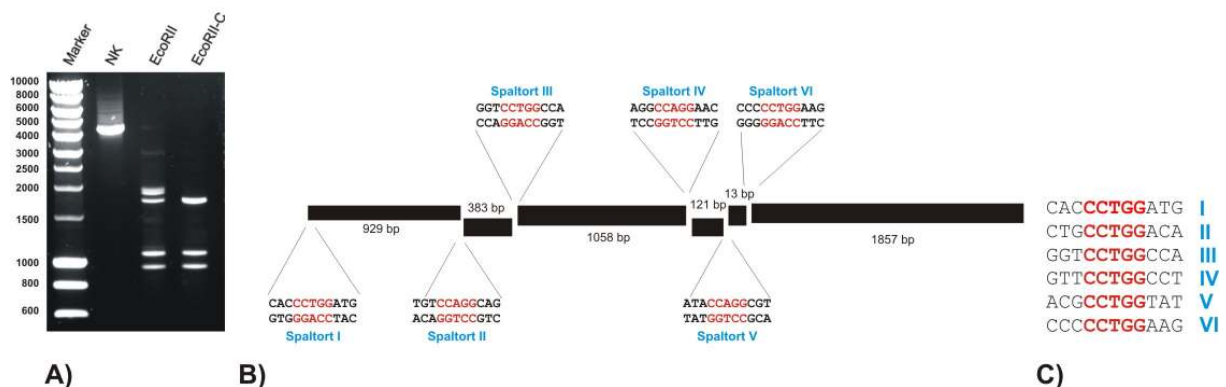


Abbildung 32: Übersichtsdarstellung der pBR322 Spaltprodukte durch EcoRII und EcoRII-C. A) zeigt ein 1% Agarosegel mit 150 ng gespaltener und ungespaltener pBR322 DNA. Für die Spaltung wurde jeweils ein Verhältnis von 2:1 von Enzym über Erkennungsort eingesetzt. NK bezeichnet die ungespaltene pBR322 DNA. Der verwendete Marker war der „Smart ladder“ (Eurogentec). B) zeigt das Schema des linearen pBR322 Plasmides mit allen EcoRII-Spaltorten. Die Erkennungssequenzen sind jeweils rot hervorgehoben. Die Spaltorte sind von I bis VI nummeriert (blau). C) stellt die zu den Spaltorten I bis VI gehörenden T-Stränge mit hervorgehobener EcoRII-Erkennungssequenz dar.

Interessanterweise zeigt die Spaltung von pBR322 Plasmid-DNA durch EcoRII und das verkürzte Enzym EcoRII-C ein teilweise abweichendes Spaltbild (Abb. 32A). Beim Vergleich der entstehenden Spaltprodukte beider Enzyme wird deutlich, dass das durch EcoRII entstehende partielle Spaltprodukt zwischen 1857 und 2000 bp Länge, nur durch eine nicht stattfindende Spaltung der Spaltorte V und VI entstehen kann (Ab. 32B). Die Spaltung durch EcoRII-C ist im Gegensatz dazu vollständig. Die-

ses Ergebnis lässt vermuten, dass die Spaltorte V (ACGCCTGGTAT) und VI (CCCCCTGGAAG) durch EcoRII und EcoRII-C unterschiedlich effizient gespalten werden. Da EcoRII-C die N-terminale Domäne fehlt, beruht dieser Effekt vermutlich auf der durch die N-terminale Domäne vermittelten DNA-Bindung. Da die Abstände zwischen den EcoRII-Spaltorten im pBR322 Plasmid nicht ungewöhnlich groß sind, muss der beobachtete Effekt auf einer anderen Eigenschaft als der Distanz zwischen den Erkennungsorten beruhen. Dieser Effekt könnte an der 3-D Struktur der DNA außerhalb der Erkennungssequenz liegen, die durch die benachbarten Basenpaare maßgeblich bestimmt wird [119]. Die Spaltorte V und VI werden im T-Strang, rechts der Erkennungssequenz von dem Basentriplett TAT bzw. AAG flankiert, die vermutlich eine Veränderung der Eigenschaften der „kleinen Furche“ der DNA bewirken, wodurch eine Störung der Interaktion zwischen den Aminosäuren Lys376 und Lys377 und der DNA verursacht werden könnte (Abb. 32C) [118,119].

Diese Ergebnisse lassen einen zusätzlichen DNA-Erkennungsmechanismus bei EcoRII vermuten, bei dem die benachbarten Basenpaare außerhalb der Erkennungssequenz eine Rolle spielen.

4.3 Charakterisierung von M.EcoRII mit Hilfe von biochemischen und kristallographischen Methoden

Für einen vollständigen Überblick über die Eigenschaften des EcoRII-R/M Systems haben wir zusätzlich zu der EcoRII-Restriktionsendonuklease auch die korrespondierende Methyltransferase in einen Expressionsvektor kloniert. Durch den N-terminalen 6xHis-Tag ist es uns gelungen die Proteinreinigung zu vereinfachen, um große Mengen reinen Proteins zu gewinnen. Bei Experimenten zur Charakterisierung der Methyltransferase zeigte sich, dass die Methylierungsaktivität nicht von den ersten 113 N-terminalen Aminosäuren abhängig ist. Das von uns hergestellte N-terminal verkürzte Mutantenzym M.EcoRII 114-512 zeigte wie bereits beschrieben DNA Methylierungsaktivität [73]. Das Mutantenzym M.EcoRII 1-113 (Abb. 33) zeigte dagegen keine Methylierungsaktivität.

Um die Hypothese zu prüfen, ob M.EcoRII über eine Bindung an den eigenen Promotor die eigene Expression regulieren kann, wurden bereits zahlreiche EMSA-

Experimente durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass M.EcoRII an den eigenen

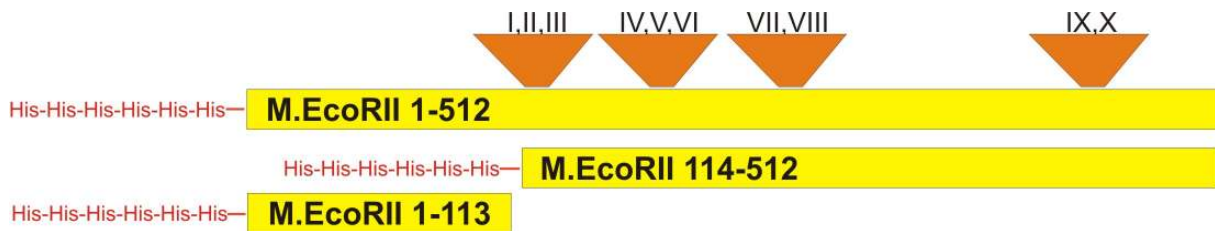


Abbildung 33: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten M.EcoRII-Mutantenenzyme. Die funktionellen Strukturmodule der Methyltransferase sind jeweils durch römische Zahlen an den entsprechenden Positionen und orangefarbene Pfeile abgebildet.

Promotor binden kann [74,75,76]. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass bereits ein Oligonukleotidduplex von 38 Basen mit der Promotorsequenz für eine spezifische Bindung ausreicht. Weiterhin konnten wir zeigen, dass für die spezifische Bindung die vollständige Promotorsequenz notwendig ist. Die Vermutung, dass zwei M.EcoRII-Moleküle an jeweils eine palindromische Sequenz innerhalb des Promotors binden [76], konnte von uns nicht bestätigt werden. Wir konnten zeigen, dass Oligonukleotide, die nur die halbe Promotorsequenz enthalten und somit nur eine der putativen palindromischen Erkennungssequenzen beinhalten, nur schwach (k_D 910 nM) gebunden werden. Für die Bindung von M.EcoRII an den eigenen Promotor ist die ganze Promotorsequenz erforderlich.

Die EMSA-Experimente mit den verkürzten Mutantenzymen offenbarten ebenfalls interessante Ergebnisse. Dabei zeigte sich, dass durch die Deletion der ersten 113 N-terminalen Aminosäuren die Bindung des Mutantenzym M.EcoRII 114-512 an die Erkennungsort-DNA von 9,5 nM auf 82,5 nM verschlechtert wird. Die Affinität zur Promotorsequenz-DNA wurde bei M.EcoRII 114-512 im Vergleich zum WT-Enzym von 59,5 nM auf 400 nM verschlechtert. Dies stellt eine ca. 7-fach schlechtere Bindungsaffinität dar. Die Affinität des Mutantenzym M.EcoRII 114-512 zur un-spezifischen DNA wurde im Gegensatz dazu kaum beeinflusst. Die Experimente mit dem C-terminal verkürzten Enzym M.EcoRII 1-113 (Abb. 33) zeigten eindeutig, dass die ersten 113 N-terminalen Aminosäuren weder an DNA mit der Promotorsequenz noch an DNA mit der Erkennungssequenz binden. Für M.EcoRII ist bereits gezeigt worden, dass Deletionen von 4-5 Aminosäuren innerhalb der ersten 85 N-terminalen Aminosäuren zu einer verschlechterten Bindung des Enzyms an die eigene Promotorsequenz führen. Durch diese Experimente gestützt, wurde für M.EcoRII ein Regulationsmechanismus aufgestellt, bei dem auf der Ebene der Transkription die eigene

Expression reguliert wird. Bei diesem Mechanismus wird durch Bindung von M.EcoRII an den eigenen Promotor die eigene Expression gehemmt [74,76]. Die Ergebnisse unserer Bindungsexperimente unterstützen dieses Modell. Wir konnten zeigen, dass die Deletion der ersten 113 N-terminalen Aminosäuren zu einer 7-fach schwächeren Bindung des Enzyms an die Promotorsequenz führt. Diese Schwächung ermöglicht eine verbesserte Zugänglichkeit der RNA-Polymerase an den M.EcoRII-Promotor. Die N-terminale Region ist somit maßgeblich an der Autoregulation der M.EcoRII-Transkription beteiligt.

Interessanterweise zeigt M.EcoRII 114-512 auch gegenüber anderen DNA-Substraten eine schwächere Bindung. Die ersten 113 N-terminalen Aminosäuren müssen somit an der Bindung an den DNA-Erkennungsort, als auch an der Bindung an den Promotorbereich des *ecoRII*-Gens beteiligt sein. Dies bedeutet auch, dass M.EcoRII 114-512 außerhalb der N-terminalen Region über DNA-Bindungsregionen verfügen muss, die spezifische, unspezifische und Promotor-DNA binden können, da trotz des Fehlens der 113 N-terminalen Aminosäuren sequenzspezifische Bindung an den Promotor möglich ist.

Es ist bereits diskutiert worden, dass M.EcoRII aufgrund der für Methyltransferasen ungewöhnlichen Größe über eine zusätzliche Funktion verfügen könnte, wie beispielweise eine zweite DNA-Erkennungsspezifität [80].

Um die an der DNA-Bindung beteiligten Regionen von M.EcoRII zu untersuchen, haben wir Proteolyse-Experimente durchgeführt. Diese Experimente haben eindeutig gezeigt, dass eine bzw. zwei Domänen in Anwesenheit von DNA vor der Proteolyse geschützt werden. Dabei wurde deutlich, dass der vermittelte Schutz DNA- sowie Kofaktor abhängig ist. Unsere Experimente offenbarten, dass die Methyltransferase ohne Zugabe von spezifischer DNA innerhalb von wenigen Stunden vollständig verdaut wurde. Die Zugabe der Promotorsequenz führte im Gegensatz dazu zur Anreicherung von zwei stabilen Fragmenten, welche Kofaktor unabhängig entstanden. Das auf der Höhe der 25 kD Markerbande laufende Fragment entspricht der N-terminalen Sequenz 1-214, welches die konservierten Motive I bis III und Teile von IV beinhaltet (Abb. 34). Das bei 35 kD laufende Fragment konnte mit Hilfe der Massenspektroskopie eindeutig als der C-terminale Bereich zwischen den Aminosäuren 249-512 identifiziert werden.



Abbildung 34: Sequenzvergleich von M.EcoRII mit anderen Methyltransferasen. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 durchgeführt. Die Abbildung zeigt die für Methyltransferasen charakteristischen Funktionsmotive I-X, die durch rote Rahmen hervorgehoben sind [80]. Die durch unsere proteolytischen Experimente und den spezifischen Antikörpernachweis identifizierte N-terminale Region 1-214 ist lila, die durch Massenspektroskopie identifizierte C-terminale Region 249-512 grün dargestellt.

Dieses Fragment besteht aus den 263 C-terminalen Aminosäuren und enthält die Motive VI bis X. Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragmentes beträgt 30 kD. Die Differenz zwischen dem theoretischen Molekulargewicht dieses Fragmentes und der Schätzung des Molekulargewichtes aus dem SDS-Gel beträgt 5 kD und ist vermutlich auf die schwache Auflösung des SDS-Gels zurückzuführen. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bereiche 1-214 sowie 249-512 an der spezifischen DNA-Bindung beteiligt sind, da nur eine enge Bindung der Methyltransferase an DNA vor Proteolyse schützen kann. In Anwesenheit der Promotor-DNA ist diese Bindung Kofaktor unabhängig. In Anwesenheit der Erkennungsort-DNA hingegen erfolgt diese spezifische Bindung nur wenn die Kofaktoren AdoMet oder Sinefungin im Ansatz vorhanden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Bindung von M.EcoRII an den Promotor und den Erkennungsort mit AdoMet und Sinefungin der Enzym-DNA-Komplex ähnlich aufgebaut sein muss, da die gleichen Bereiche des Enzyms sensitiv gegenüber Trypsin sind und somit die gleichen Regionen vor proteolytischer Spaltung geschützt werden. Die Experimente mit der Erkennungsort-DNA zeigen, dass eine Zugabe von AdoHcy das gesamte Enzym vor proteolytischer

Spaltung schützt. Die in der Literatur beschriebene proteolytische Abtrennung der 85 N-terminalen Aminosäuren konnten wir nur in einem geringen Maße beobachten [73,115,116,117]. Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass wir in unseren Experimenten native und nicht chemisch vernetzte Protein-DNA-Komplexe untersucht haben. Die Beobachtung, dass unspezifische DNA auch einen kurzfristigen Schutz vor proteolytischer Spaltung vermittelt, lässt vermuten, dass M.EcoRII mit unterschiedlicher Affinität und in verschiedenen Konformationen an Erkennungsort-, Promotor- und unspezifische DNA bindet. Die im 25 kD Fragment enthaltenen Motive I bis IV sind in der Literatur als AdoMet-bindende Motive beschrieben worden, die bei der Übertragung der Methylgruppe auf die DNA eine Rolle spielen sollen. Eine weitere Funktion dieser Motive liegt in der Stabilisierung und Bindung der „herausgeflippten“ Base während der spezifischen DNA-Bindung [80,120,121,122]. Unsere Experimente zeigen, dass die Motive I bis IV auch eine Rolle in der spezifischen DNA-Bindung der Promotor- und Erkennungsort-DNA spielen müssen. Die Motive VI bis X, die in dem massenspektroskopisch identifizierten 30 kD großen Fragment lokalisiert sind, enthalten die spezifische DNA-Binderegion (Abb. 34). Interessanterweise erfolgt der Schutz dieses Fragmentes in Anwesenheit der Erkennungsort- und Promotor-DNA gleichermaßen, obwohl die Promotorsequenz keinen M.EcoRII-Erkennungsort beinhaltet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine zusätzliche DNA-Bindungsregion zwischen den Motiven VI und X vorhanden sein muss, die die Promotorsequenz erkennt. Diese Vermutung wird durch EMSA-Experimente mit M.EcoRII 114-512 bestärkt, bei denen trotz Deletion der N-terminalen Aminosäuren nur eine 7-fach schwächere Bindung an die Promotorsequenz festgestellt wurde.

Unsere Vermutung, dass verschiedene Protein-DNA-Konformationen, abhängig von DNA und Kofaktor, gebildet werden, wurde bereits für M.EcoRI und M.HhaI bestätigt. Bei diesen Untersuchungen wurde ebenfalls gezeigt, dass M.HhaI mit der DNA außerhalb der kanonischen Erkennungssequenz interagieren kann [57,62,123].

Unsere Versuche M.EcoRII zu kristallisieren waren erfolgreich. Es ist uns zum ersten Mal gelungen, streuende Kristalle von M.EcoRII und hemimethylierter DNA herzustellen. Die Auflösung dieser Kristalle war leider nicht ausreichend um die Struktur der Methyltransferase zu lösen. Diese vielversprechenden Versuche lassen aber darauf hoffen, in naher Zukunft die Struktur von M.EcoRII in Anwesenheit von hemimethylierter DNA lösen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnten strukturelle und funktionelle Daten über die Restriktionsendonuklease EcoRII als auch über die Methyltransferase M.EcoRII gesammelt werden. Diese Ergebnisse ermöglichen erstmals einen genauen Einblick in den EcoRII Autoinhibitions- und Mg^{+} -Bindungsmechanismus und können somit helfen den Prozess der DNA-Erkennung und -Spaltung in Anwesenheit von Mg^{2+} besser zu verstehen. Die gesammelten Daten über M.EcoRII zeigen die an der transkriptionellen Regulation beteiligten Domänen und offenbaren auch die Kofaktorabhängigkeit bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung. Diese Ergebnisse könnten in Zukunft dazu verwendet werden stabile Protein-DNA-Komplexe herzustellen, die zur Kristallisation und zur Strukturlösung notwendig sind.

Literaturverzeichnis

- [1] Arber, W. (1979): Promotion and limitation of genetic exchange, *Experientia* (Band 35), Nr. 3, Seite 287-93
- [2] Whitman, W. B.; Coleman, D. C. und Wiebe, W. J. (1998): Prokaryotes: the unseen majority, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 12, Seite 6578-83
- [3] Pedulla, M. L.; Ford, M. E.; Houtz, J. M.; Karthikeyan, T.; Wadsworth, C.; Lewis, J. A.; Jacobs-Sera, D.; Falbo, J.; Gross, J.; Pannunzio, N. R.; Brucker, W.; Kumar, V.; Kandasamy, J.; Keenan, L.; Bardarov, S.; Kriakov, J.; Lawrence, J. G.; Jacobs, W. R., Jr.; Hendrix, R. W. und Hatfull, G. F. (2003): Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes, *Cell* (Band 113), Nr. 2, Seite 171-82
- [4] Roberts, R. J.; Vincze, T.; Posfai, J. und Macelis, D. (2009): REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Res*, 38 (Datenbank Band): D234-D236
- [5] Naito, T.; Kusano, K. und Kobayashi, I. (1995): Selfish behavior of restriction-modification systems, *Science* (Band 267), Nr. 5199, Seite 897-9
- [6] Rocha, E. P.; Danchin, A. und Viari, A. (2001): Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis, *Genome Res* (Band 11), Nr. 6, Seite 946-58
- [7] Hayes, F. (2003): Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest, *Science* (Band 301), Nr. 5639, Seite 1496-9
- [8] Kedzierska, B.; Lian, L. Y. und Hayes, F. (2007): Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression, *Nucleic Acids Res* (Band 35), Nr. 1, Seite 325-39
- [9] Thisted, T.; Sorensen, N. S. und Gerdes, K. (1995): Mechanism of post-segregational killing: secondary structure analysis of the entire Hok mRNA from plasmid R1 suggests a fold-back structure that prevents translation and antisense RNA binding, *J Mol Biol* (Band 247), Nr. 5, Seite 859-73
- [10] Jensen, R. B.; Grohmann, E.; Schwab, H.; Diaz-Orejas, R. und Gerdes, K. (1995): Comparison of ccd of F, parDE of RP4, and parD of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1, *Mol Microbiol* (Band 17), Nr. 2, Seite 211-20
- [11] Jensen, R. B. und Gerdes, K. (1995): Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems, *Mol Microbiol* (Band 17), Nr. 2, Seite 205-10
- [12] Stoddard, B. L. (2005): Homing endonuclease structure and function, *Q Rev Biophys* (Band 38), Nr. 1, Seite 49-95

- [13] Takahashi, N.; Naito, Y.; Handa, N. und Kobayashi, I. (2002): A DNA methyltransferase can protect the genome from postdisturbance attack by a restriction-modification gene complex, *J Bacteriol* (Band 184), Nr. 22, Seite 6100-8
- [14] Ohno, S.; Handa, N.; Watanabe-Matsui, M.; Takahashi, N. und Kobayashi, I. (2008): Maintenance forced by a restriction-modification system can be modulated by a region in its modification enzyme not essential for methyltransferase activity, *J Bacteriol* (Band 190), Nr. 6, Seite 2039-49
- [15] Arber, W. (2000): Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution, *FEMS Microbiol Rev* (Band 24), Nr. 1, Seite 1-7
- [16] Sumbly, P. und Smith, M. C. (2003): Phase variation in the phage growth limitation system of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J Bacteriol* (Band 185), Nr. 15, Seite 4558-63
- [17] Dybvig, K.; Sitaraman, R. und French, C. T. (1998): A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 23, Seite 13923-8
- [18] Badie, G.; Heithoff, D. M.; Sinsheimer, R. L. und Mahan, M. J. (2007): Altered levels of *Salmonella* DNA adenine methylase are associated with defects in gene expression, motility, flagellar synthesis, and bile resistance in the pathogenic strain 14028 but not in the laboratory strain LT2, *J Bacteriol* (Band 189), Nr. 5, Seite 1556-64
- [19] Mucke, M.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2003): Diversity of type II restriction endonucleases that require two DNA recognition sites, *Nucleic Acids Res* (Band 31), Nr. 21, Seite 6079-84
- [20] Pingoud, A. und Jeltsch, A. (2001): Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Res* (Band 29), Nr. 18, Seite 3705-27
- [21] Roberts, R. J.; Belfort, M.; Bestor, T.; Bhagwat, A. S.; Bickle, T. A.; Bitinaite, J.; Blumenthal, R. M.; Degtyarev, S.Kh.; Dryden, D. T.; Dybvig, K.; Firman, K.; Gromova, E. S.; Gumpert, R. I.; Halford, S. E.; Hattman, S.; Heitman, J.; Hornby, D. P.; Janulaitis, A.; Jeltsch, A.; Josephsen, J.; Kiss, A.; Klaenhammer, T. R.; Kobayashi, I.; Kong, H.; Kruger, D. H.; Lacks, S.; Marinus, M. G.; Miyahara, M.; Morgan, R. D.; Murray, N. E.; Nagaraja, V.; Piekarowicz, A.; Pingoud, A.; Raleigh, E.; Rao, D. N.; Reich, N.; Repin, V. E.; Selker, E. U.; Shaw, P. C.; Stein, D. C.; Stoddard, B. L.; Szybalski, W.; Trautner, T. A.; Van Etten, J. L.; Vitor, J. M.; Wilson, G. G. und Xu, S. Y. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res* (Band 31), Nr. 7, Seite 1805-12
- [22] Heithoff, D. M.; Sinsheimer, R. L.; Low, D. A. und Mahan, M. J. (1999): An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence, *Science* (Band 284), Nr. 5416, Seite 967-70
- [23] Low, D. A.; Weyand, N. J. und Mahan, M. J. (2001): Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence, *Infect Immun* (Band 69), Nr. 12, Seite 7197-204

- [24] Ashworth, J.; Havranek, J. J.; Duarte, C. M.; Sussman, D.; Monnat, R. J., Jr.; Stoddard, B. L. und Baker, D. (2006): Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity, *Nature* (Band 441), Nr. 7093, Seite 656-9
- [25] Bibikova, M.; Carroll, D.; Segal, D. J.; Trautman, J. K.; Smith, J.; Kim, Y. G. und Chandrasegaran, S. (2001): Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases, *Mol Cell Biol* (Band 21), Nr. 1, Seite 289-97
- [26] Szczepek, M.; Brondani, V.; Buchel, J.; Serrano, L.; Segal, D. J. und Cathomen, T. (2007): Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases, *Nat Biotechnol* (Band 25), Nr. 7, Seite 786-93
- [27] Tsutakawa, S. E.; Jingami, H. und Morikawa, K. (1999): Recognition of a TG mismatch: the crystal structure of very short patch repair endonuclease in complex with a DNA duplex, *Cell* (Band 99), Nr. 6, Seite 615-23
- [28] Tsutakawa, S. E.; Muto, T.; Kawate, T.; Jingami, H.; Kunishima, N.; Ariyoshi, M.; Kohda, D.; Nakagawa, M. und Morikawa, K. (1999): Crystallographic and functional studies of very short patch repair endonuclease, *Mol Cell* (Band 3), Nr. 5, Seite 621-8
- [29] Ban, C. und Yang, W. (1998): Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases, *EMBO J* (Band 17), Nr. 5, Seite 1526-34
- [30] Bujnicki, J. M.; Rotkiewicz, P.; Kolinski, A. und Rychlewski, L. (2001): Three-dimensional modeling of the I-TevI homing endonuclease catalytic domain, a GLY-YIG superfamily member, using NMR restraints and Monte Carlo dynamics, *Protein Eng* (Band 14), Nr. 10, Seite 717-21
- [31] Bujnicki, J. M. und Rychlewski, L. (2001): The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis, *Virus Genes* (Band 22), Nr. 2, Seite 219-30
- [32] Dias, A.; Bouvier, D.; Crepin, T.; McCarthy, A. A.; Hart, D. J.; Baudin, F.; Cusack, S. und Ruigrok, R. W. (2009): The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit, *Nature* (Band 458), Nr. 7240, Seite 914-8
- [33] Bannister, D. und Glover, S. W. (1968): Restriction and modification of bacteriophages by R+ strains of Escherichia coli K12, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 30), Nr. 6, Seite 735-8
- [34] Glover, S. W. und Piekarowicz, A. (1972): Host specificity of DNA in Haemophilus influenzae: restriction and modification in strain Rd, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 46), Nr. 4, Seite 1610-7
- [35] Boyer, H. W.; Chow, L. T.; Dugaiczky, A.; Hedgpeth, J. und Goodman, H. M. (1973): DNA substrate site for the EcoRII restriction endonuclease and modification methylase, *Nat New Biol* (Band 244), Nr. 132, Seite 40-3

- [36] Kosykh, V. G.; Buryanov, Y. I. und Bayev, A. A. (1980): Molecular cloning of EcoRII endonuclease and methylase genes, *Mol Gen Genet* (Band 178), Nr. 3, Seite 717-8
- [37] Kosykh, V. G.; Puntezhis, S. A.; Bur'ianov Ia, I. und Baev, A. A. (1982): [Isolation, purification and properties of restriction endonuclease EcoRII], *Biokhimiia* (Band 47), Nr. 4, Seite 619-25
- [38] Som, S.; Bhagwat, A. S. und Friedman, S. (1987): Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the EcoRII modification enzyme, *Nucleic Acids Res* (Band 15), Nr. 1, Seite 313-32
- [39] Bhagwat, A. S.; Johnson, B.; Weule, K. und Roberts, R. J. (1990): Primary sequence of the EcoRII endonuclease and properties of its fusions with beta-galactosidase, *J Biol Chem* (Band 265), Nr. 2, Seite 767-73
- [40] Kruger, D. H.; Barcak, G. J.; Reuter, M. und Smith, H. O. (1988): EcoRII can be activated to cleave refractory DNA recognition sites, *Nucleic Acids Res* (Band 16), Nr. 9, Seite 3997-4008
- [41] Pein, C. D.; Reuter, M.; Meisel, A.; Cech, D. und Kruger, D. H. (1991): Activation of restriction endonuclease EcoRII does not depend on the cleavage of stimulator DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 19), Nr. 19, Seite 5139-42
- [42] Topal, M. D. und Conrad, M. (1993): Changing endonuclease EcoRII Tyr308 to Phe abolishes cleavage but not recognition: possible homology with the Int-family of recombinases, *Nucleic Acids Res* (Band 21), Nr. 11, Seite 2599-603
- [43] Reuter, M.; Kupper, D.; Meisel, A.; Schroeder, C. und Kruger, D. H. (1998): Cooperative binding properties of restriction endonuclease EcoRII with DNA recognition sites, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 14, Seite 8294-300
- [44] Mucke, M.; Lurz, R.; Mackeldanz, P.; Behlke, J.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2000): Imaging DNA loops induced by restriction endonuclease EcoRII. A single amino acid substitution uncouples target recognition from cooperative DNA interaction and cleavage, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 39, Seite 30631-7
- [45] Reuter, M.; Schneider-Mergener, J.; Kupper, D.; Meisel, A.; Mackeldanz, P.; Kruger, D. H. und Schroeder, C. (1999): Regions of endonuclease EcoRII involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 8, Seite 5213-21
- [46] Mucke, M.; Grelle, G.; Behlke, J.; Kraft, R.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2002): EcoRII: a restriction enzyme evolving recombination functions?, *EMBO J* (Band 21), Nr. 19, Seite 5262-8
- [47] Mucke, M.; Pingoud, V.; Grelle, G.; Kraft, R.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2002): Asymmetric photocross-linking pattern of restriction endonuclease EcoRII to the DNA recognition sequence, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 16, Seite 14288-93

- [48] Zhou, X. E.; Wang, Y.; Reuter, M.; Mucke, M.; Kruger, D. H.; Meehan, E. J. und Chen, L. (2004): Crystal structure of type IIE restriction endonuclease EcoRII reveals an autoinhibition mechanism by a novel effector-binding fold, *J Mol Biol* (Band 335), Nr. 1, Seite 307-19
- [49] Tamulaitis, G.; Sasnauskas, G.; Mucke, M. und Siksnys, V. (2006): Simultaneous binding of three recognition sites is necessary for a concerted plasmid DNA cleavage by EcoRII restriction endonuclease, *J Mol Biol* (Band 358), Nr. 2, Seite 406-19
- [50] Shlyakhtenko, L. S.; Gilmore, J.; Portillo, A.; Tamulaitis, G.; Siksnys, V. und Lyubchenko, Y. L. (2007): Direct visualization of the EcoRII-DNA triple synaptic complex by atomic force microscopy, *Biochemistry* (Band 46), Nr. 39, Seite 11128-36
- [51] Subach, F.; Kirsanova, O.; Liquier, J. und Gromova, E. S. (2008): Resolution of the EcoRII restriction endonuclease-DNA complex structure in solution using fluorescence spectroscopy, *Biophys Chem* (Band 138), Nr. 3, Seite 107-14
- [52] Klimasauskas, S.; Kumar, S.; Roberts, R. J. und Cheng, X. (1994): HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix, *Cell* (Band 76), Nr. 2, Seite 357-69
- [53] Tamulaitis, G.; Zaremba, M.; Szczepanowski, R. H.; Bochtler, M. und Siksnys, V. (2007): Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence, *Nucleic Acids Res* (Band 35), Nr. 14, Seite 4792-9
- [54] Golovenko, D.; Manakova, E.; Tamulaitiene, G.; Grazulis, S. und Siksnys, V. (2009): Structural mechanisms for the 5'-CCWGG sequence recognition by the N- and C-terminal domains of EcoRII, *Nucleic Acids Res* (Band 37), Nr. 19, Seite 6613-24
- [55] Yamasaki, K.; Kigawa, T.; Inoue, M.; Tateno, M.; Yamasaki, T.; Yabuki, T.; Aoki, M.; Seki, E.; Matsuda, T.; Tomo, Y.; Hayami, N.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Osanai, T.; Tanaka, A.; Seki, M.; Shinozaki, K. und Yokoyama, S. (2004): Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1, *Plant Cell* (Band 16), Nr. 12, Seite 3448-59
- [56] Cheng, X. (1995): Structure and function of DNA methyltransferases, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (Band 24), Seite 293-318
- [57] Sankpal, U. T. und Rao, D. N. (2002): Structure, function, and mechanism of HhaI DNA methyltransferases, *Crit Rev Biochem Mol Biol* (Band 37), Nr. 3, Seite 167-97
- [58] Bujnicki, J. M. (2002): Sequence permutations in the molecular evolution of DNA methyltransferases, *BMC Evol Biol* (Band 2), Seite 3
- [59] Malone, T.; Blumenthal, R. M. und Cheng, X. (1995): Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes, *J Mol Biol* (Band 253), Nr. 4, Seite 618-32

- [60] Roth, M.; Helm-Kruse, S.; Friedrich, T. und Jeltsch, A. (1998): Functional roles of conserved amino acid residues in DNA methyltransferases investigated by site-directed mutagenesis of the EcoRV adenine-N6-methyltransferase, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 28, Seite 17333-42
- [61] Bheemanaik, S.; Reddy, Y. V. und Rao, D. N. (2006): Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases, *Biochem J* (Band 399), Nr. 2, Seite 177-90
- [62] Sankpal, U. T. und Rao, D. N. (2002): Mutational analysis of conserved residues in HhaI DNA methyltransferase, *Nucleic Acids Res* (Band 30), Nr. 12, Seite 2628-38
- [63] Cheng, X. und Roberts, R. J. (2001): AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping, *Nucleic Acids Res* (Band 29), Nr. 18, Seite 3784-95
- [64] Kossykh, V. G.; Schlagman, S. L. und Hattman, S. (1995): Function of Pro-185 in the ProCys of conserved motif IV in the EcoRII [cytosine-C5]-DNA methyltransferase, *FEBS Lett* (Band 370), Nr. 1-2, Seite 75-7
- [65] Schluckebier, G.; O'Gara, M.; Saenger, W. und Cheng, X. (1995): Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases, *J Mol Biol* (Band 247), Nr. 1, Seite 16-20
- [66] Klimasauskas, S.; Nelson, J. L. und Roberts, R. J. (1991): The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases, *Nucleic Acids Res* (Band 19), Nr. 22, Seite 6183-90
- [67] Klimasauskas, S.; Timinskas, A.; Menkevicius, S.; Butkiene, D.; Butkus, V. und Janulaitis, A. (1989): Sequence motifs characteristic of DNA[cytosine-N4]methyltransferases: similarity to adenine and cytosine-C5 DNA-methylases, *Nucleic Acids Res* (Band 17), Nr. 23, Seite 9823-32
- [68] Liebert, K.; Hermann, A.; Schlickerrieder, M. und Jeltsch, A. (2004): Stopped-flow and mutational analysis of base flipping by the Escherichia coli Dam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase, *J Mol Biol* (Band 341), Nr. 2, Seite 443-54
- [69] Collier, J. (2009): Epigenetic regulation of the bacterial cell cycle, *Curr Opin Microbiol* (Band 12), Nr. 6, Seite 722-9
- [70] Palmer, B. R. und Marinus, M. G. (1994): The dam and dcm strains of Escherichia coli--a review, *Gene* (Band 143), Nr. 1, Seite 1-12
- [71] Malygin, E. G.; Evdokimov, A. A. und Hattman, S. (2009): Dimeric/oligomeric DNA methyltransferases: an unfinished story, *Biol Chem* (Band 390), Nr. 9, Seite 835-44
- [72] Schroeder, S. G. und Samudzi, C. T. (1997): Structural studies of EcoRII methylase: exploring similarities among methylases, *Protein Eng* (Band 10), Nr. 12, Seite 1385-93

- [73] Friedman, S.; Som, S. und Yang, L. F. (1991): The core element of the EcoRII methylase as defined by protease digestion and deletion analysis, *Nucleic Acids Res* (Band 19), Nr. 19, Seite 5403-8
- [74] Friedman, S. und Som, S. (1993): Induction of EcoRII methyltransferase: evidence for autogenous control, *J Bacteriol* (Band 175), Nr. 19, Seite 6293-8
- [75] Som, S. und Friedman, S. (1993): Autogenous regulation of the EcoRII methylase gene at the transcriptional level: effect of 5-azacytidine, *EMBO J* (Band 12), Nr. 11, Seite 4297-303
- [76] Som, S. und Friedman, S. (1994): Regulation of EcoRII methyltransferase: effect of mutations on gene expression and in vitro binding to the promoter region, *Nucleic Acids Res* (Band 22), Nr. 24, Seite 5347-53
- [77] Som, S. und Friedman, S. (1994): Inhibition of transcription in vitro by binding of DNA (cytosine-5)-methylases to DNA templates containing cytosine analogs, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 42, Seite 25986-91
- [78] Subach, O. M.; Khoroshaev, A. V.; Gerasimov, D. N.; Baskunov, V. B.; Shchyolkina, A. K. und Gromova, E. S. (2004): 2-Pyrimidinone as a probe for studying the EcoRII DNA methyltransferase-substrate interaction, *Eur J Biochem* (Band 271), Nr. 12, Seite 2391-9
- [79] Baskunov, V. B.; Subach, F. V.; Kolbanovskiy, A.; Kolbanovskiy, M.; Eremin, S. A.; Johnson, F.; Bonala, R.; Geacintov, N. E. und Gromova, E. S. (2005): Effects of benzo[a]pyrene-deoxyguanosine lesions on DNA methylation catalyzed by EcoRII DNA methyltransferase and on DNA cleavage effected by EcoRII restriction endonuclease, *Biochemistry* (Band 44), Nr. 3, Seite 1054-66
- [80] Kudan, E. V.; Brevnov, M. G.; Subach, O. M.; Rechkoblit, O. A.; Buinitskii Ia, M. und Gromova, E. S. (2007): [Probing of contacts between EcoRII DNA methyltransferase and DNA using substrate analogs and molecular modeling], *Mol Biol (Mosk)* (Band 41), Nr. 5, Seite 885-99
- [81] Gritsenko, O. M.; Koudan, E. V.; Mikhailov, S. N.; Ermolinsky, B. S.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. und Gromova, E. S. (2002): Affinity modification of EcoRII DNA methyltransferase by the dialdehyde-substituted DNA duplexes: mapping the enzyme region that interacts with DNA, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* (Band 21), Nr. 11-12, Seite 753-64
- [82] Drenth, Jan und Mesters, Jeroen (2007): Principles of protein X-Ray crystallography, 3rd. Auflage, Springer, New York, ISBN: 0387333347 (hbk. alk. paper) 9780387333342 (hbk. alk. paper), 0387337466 (e-ISBN), 9780387337463 (e-ISBN)
- [83] Drenth, Jan (1994): Principles of protein X-ray crystallography, Springer advanced texts in chemistry., Springer-Verlag, New York, ISBN: 038794091X (New York acid-free paper), 354094091X (Berlin acid-free paper)

- [84] McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C. und Read, R. J. (2007): Phaser crystallographic software, *J Appl Crystallogr* (Band 40), Nr. 4, Seite 658-674
- [85] Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* (Band 18), Nr. 15, Seite 2714-23
- [86] Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* (Band 23), Nr. 21, Seite 2947-8
- [87] Kaus-Drobek, M.; Czapinska, H.; Sokolowska, M.; Tamulaitis, G.; Szczepanowski, R. H.; Urbanke, C.; Siksnys, V. und Bochtler, M. (2007): Restriction endonuclease MvaI is a monomer that recognizes its target sequence asymmetrically, *Nucleic Acids Res* (Band 35), Nr. 6, Seite 2035-46
- [88] Schymkowitz, J.; Borg, J.; Stricher, F.; Nys, R.; Rousseau, F. und Serrano, L. (2005): The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids Res* (Band 33), Nr. Web Server issue, Seite W382-8
- [89] Kupper, D.; Reuter, M.; Mackeldanz, P.; Meisel, A.; Alves, J.; Schroeder, C. und Kruger, D. H. (1995): Hyperexpressed EcoRII renatured from inclusion bodies and native enzyme both exhibit essential cooperativity with two DNA sites, *Protein Expr Purif* (Band 6), Nr. 1, Seite 1-9
- [90] Dokmanic, I.; Sikic, M. und Tomic, S. (2008): Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (Band 64), Nr. 3, Seite 257-63
- [91] Tamulaitis, G.; Mucke, M. und Siksnys, V. (2006): Biochemical and mutational analysis of EcoRII functional domains reveals evolutionary links between restriction enzymes, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 6, Seite 1665-71
- [92] Pingoud, V.; Wende, W.; Friedhoff, P.; Reuter, M.; Alves, J.; Jeltsch, A.; Mones, L.; Fuxreiter, M. und Pingoud, A. (2009): On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family, *J Mol Biol* (Band 393), Nr. 1, Seite 140-60
- [93] Deibert, M.; Grazulis, S.; Sasnauskas, G.; Siksnys, V. und Huber, R. (2000): Structure of the tetrameric restriction endonuclease NgoMIV in complex with cleaved DNA, *Nat Struct Biol* (Band 7), Nr. 9, Seite 792-9
- [94] Bochtler, M.; Szczepanowski, R. H.; Tamulaitis, G.; Grazulis, S.; Czapinska, H.; Manakova, E. und Siksnys, V. (2006): Nucleotide flips determine the specificity of the Ecl18kI restriction endonuclease, *EMBO J* (Band 25), Nr. 10, Seite 2219-29

- [95] Newman, J. (2006): A review of techniques for maximizing diffraction from a protein crystal in stilla, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (Band 62), Nr. 1, Seite 27-31
- [96] Orłowski, J. und Bujnicki, J. M. (2008): Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses, *Nucleic Acids Res* (Band 36), Nr. 11, Seite 3552-69
- [97] Zaremba, M.; Sasnauskas, G.; Urbanke, C. und Siksnys, V. (2006): Allosteric communication network in the tetrameric restriction endonuclease Bse634I, *J Mol Biol* (Band 363), Nr. 4, Seite 800-12
- [98] Grazulis, S.; Manakova, E.; Roessle, M.; Bochtler, M.; Tamulaitiene, G.; Huber, R. und Siksnys, V. (2005): Structure of the metal-independent restriction enzyme BfiI reveals fusion of a specific DNA-binding domain with a nonspecific nuclease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 44, Seite 15797-802
- [99] Szczepek, M.; Mackeldanz, P.; Moncke-Buchner, E.; Alves, J.; Kruger, D. H. und Reuter, M. (2009): Molecular analysis of restriction endonuclease EcoRII from *Escherichia coli* reveals precise regulation of its enzymatic activity by autoinhibition, *Mol Microbiol* (Band 72), Nr. 4, Seite 1011-21
- [100] Kruger, D. H.; Kupper, D.; Meisel, A.; Reuter, M. und Schroeder, C. (1995): The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral DNA genomes, *FEMS Microbiol Rev* (Band 17), Nr. 1-2, Seite 177-84
- [101] Kruger, D. H.; Prosch, S.; Reuter, M. und Goebel, W. (1990): Cloning of the resistant EcoRII recognition site of phage T7 into an EcoRII-sensitive plasmid makes the site susceptible to the restriction enzyme, *J Basic Microbiol* (Band 30), Nr. 9, Seite 679-83
- [102] Gabbara, S. und Bhagwat, A. S. (1992): Interaction of EcoRII endonuclease with DNA substrates containing single recognition sites, *J Biol Chem* (Band 267), Nr. 26, Seite 18623-30
- [103] Pein, C. D.; Reuter, M.; Cech, D. und Kruger, D. H. (1989): Oligonucleotide duplexes containing CC(A/T)GG stimulate cleavage of refractory DNA by restriction endonuclease EcoRII, *FEBS Lett* (Band 245), Nr. 1-2, Seite 141-4
- [104] Li, P.; Martins, I. R.; Amarasinghe, G. K. und Rosen, M. K. (2008): Internal dynamics control activation and activity of the autoinhibited Vav DH domain, *Nat Struct Mol Biol* (Band 15), Nr. 6, Seite 613-8
- [105] Richards, J. D.; Johnson, K. A.; Liu, H.; McRobbie, A. M.; McMahon, S.; Oke, M.; Carter, L.; Naismith, J. H. und White, M. F. (2008): Structure of the DNA repair helicase hel308 reveals DNA binding and autoinhibitory domains, *J Biol Chem* (Band 283), Nr. 8, Seite 5118-26
- [106] Smith, A. J.; Szczelkun, M. D. und Savery, N. J. (2007): Controlling the motor activity of a transcription-repair coupling factor: autoinhibition and the role of RNA polymerase, *Nucleic Acids Res* (Band 35), Nr. 6, Seite 1802-11

- [107] Pufall, M. A. und Graves, B. J. (2002): Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation, *Annu Rev Cell Dev Biol* (Band 18), Seite 421-62
- [108] Ma, E.; MacRae, I. J.; Kirsch, J. F. und Doudna, J. A. (2008): Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain, *J Mol Biol* (Band 380), Nr. 1, Seite 237-43
- [109] Walkinshaw, M. D.; Taylor, P.; Sturrock, S. S.; Atanasiu, C.; Berge, T.; Henderson, R. M.; Edwardson, J. M. und Dryden, D. T. (2002): Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA, *Mol Cell* (Band 9), Nr. 1, Seite 187-94
- [110] McDonald, I. K. und Thornton, J. M. (1994): Satisfying hydrogen bonding potential in proteins, *J Mol Biol* (Band 238), Nr. 5, Seite 777-93
- [111] Reichmann, D.; Rahat, O.; Albeck, S.; Meged, R.; Dym, O. und Schreiber, G. (2005): The modular architecture of protein-protein binding interfaces, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 1, Seite 57-62
- [112] Nunes-Duby, S. E.; Kwon, H. J.; Tirumalai, R. S.; Ellenberger, T. und Landy, A. (1998): Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases, *Nucleic Acids Res* (Band 26), Nr. 2, Seite 391-406
- [113] Yamasaki, K.; Kigawa, T.; Inoue, M.; Watanabe, S.; Tateno, M.; Seki, M.; Shinozaki, K. und Yokoyama, S. (2008): Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains, *Plant Physiol Biochem* (Band 46), Nr. 3, Seite 394-401
- [114] Zhou, X. E.; Wang, Y.; Reuter, M.; Mackeldanz, P.; Kruger, D. H.; Meehan, E. J. und Chen, L. (2003): A single mutation of restriction endonuclease EcoRII led to a new crystal form that diffracts to 2.1 Å resolution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (Band 59), Nr. 5, Seite 910-2
- [115] Lambert, A. R.; Sussman, D.; Shen, B.; Maunus, R.; Nix, J.; Samuelson, J.; Xu, S. Y. und Stoddard, B. L. (2008): Structures of the rare-cutting restriction endonuclease NotI reveal a unique metal binding fold involved in DNA binding, *Structure* (Band 16), Nr. 4, Seite 558-69
- [116] Spyridaki, A.; Matzen, C.; Lanio, T.; Jeltsch, A.; Simoncsits, A.; Athanasiadis, A.; Scheuring-Vanamee, E.; Kokkinidis, M. und Pingoud, A. (2003): Structural and biochemical characterization of a new Mg(2+) binding site near Tyr94 in the restriction endonuclease PvuII, *J Mol Biol* (Band 331), Nr. 2, Seite 395-406
- [117] Gilmore, J. L.; Suzuki, Y.; Tamulaitis, G.; Siksnyš, V.; Takeyasu, K. und Lyubchenko, Y. L. (2009): Single-molecule dynamics of the DNA-EcoRII protein complexes revealed with high-speed atomic force microscopy, *Biochemistry* (Band 48), Nr. 44, Seite 10492-8
- [118] Rohs, R.; West, S. M.; Liu, P. und Honig, B. (2009): Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition, *Curr Opin Struct Biol* (Band 19), Nr. 2, Seite 171-7

- [119] Rohs, R.; West, S. M.; Sosinsky, A.; Liu, P.; Mann, R. S. und Honig, B. (2009): The role of DNA shape in protein-DNA recognition, *Nature* (Band 461), Nr. 7268, Seite 1248-53
- [120] Friedman, S. und Ansari, N. (1992): Binding of the EcoRII methyltransferase to 5-fluorocytosine-containing DNA. Isolation of a bound peptide, *Nucleic Acids Res* (Band 20), Nr. 12, Seite 3241-8
- [121] Wyszynski, M. W.; Gabbara, S. und Bhagwat, A. S. (1992): Substitutions of a cysteine conserved among DNA cytosine methylases result in a variety of phenotypes, *Nucleic Acids Res* (Band 20), Nr. 2, Seite 319-26
- [122] Wyszynski, M. W.; Gabbara, S.; Kubareva, E. A.; Romanova, E. A.; Oretskaya, T. S.; Gromova, E. S.; Shabarova, Z. A. und Bhagwat, A. S. (1993): The cysteine conserved among DNA cytosine methylases is required for methyl transfer, but not for specific DNA binding, *Nucleic Acids Res* (Band 21), Nr. 2, Seite 295-301
- [123] Reich, N. O.; Maegley, K. A.; Shoemaker, D. D. und Everett, E. (1991): Structural and functional analysis of EcoRI DNA methyltransferase by proteolysis, *Biochemistry* (Band 30), Nr. 11, Seite 2940-6

Abkürzungsverzeichnis

AdoHcv	S-Adenosyl-L-Homocysteine
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
bp	Basen Paare
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Charge-coupled Device
CD-Spektren	Circular Dichroism Spektren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His6-taq	Polv-histidine Taq (6-His) Antikörper
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kD	Kilo Dalton
$K_D / K_{D(app)}$	Dissoziationsgleichgewichtskonstante / scheinbare Dissoziationsgleichgewichtskonstante
λ-Bakteriophage	Bakteriophage Lambda
MTase	DNA-Methyltransferase
m/v	Molekulargewicht / Volumen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
NK	Negativkontrolle
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polvethylenalkohol
PK	Positivkontrolle
PVDF Membranen	Polvvinylidenfluorid Membranen
REase	Restriktionsendonuklease
R/M-Systeme	Restriktions- und Modifikationssysteme
RMS	root mean square deviation
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
T3	Bakteriophage T3
T7	Bakteriophage T7
TA-System	Toxin–Antitoxin-Systeme
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Vsr	Very short patch repair
WT	Wildtyp

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger und Frau PD Dr. Monika Reuter für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema im Institut für Virologie der Charité arbeiten zu dürfen, bedanken. Ich möchte außerdem für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung meinen Dank aussprechen. Ich fühle mich auch meinen Kooperationspartner verbunden, die bei der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben. Besonderen Dank möchte ich Professor Liquing Chen sowie Li Qiu aussprechen, die mir während meines Forschungsaufenthaltes in Huntsville (Alabama, USA) sehr geholfen haben. Ich möchte mich ebenfalls herzlich bei Prof. Dr. Jürgen Alves von der Medizinischen Hochschule in Hannover für die Zusammenarbeit bedanken. Ich möchte ebenfalls Dr. Sebastian Beck für die Analyse der proteolytischen Fragmente meinen Dank aussprechen. Besonderen Dank möchte ich an Patrick Scheerer richten, der die Auswertung und Messung der EcoRII-WT Kristalle durchgeführt hat, sowie an der Entstehung der Computer-Modelle maßgeblich beteiligt war. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die Finanzierung meines Projektes besonders freundlich bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern im Labor, Frau Dr. Monika Reuter, Frau Elisabeth Möncke-Buchner, Frau Ursula Scherneck, Frau Petra Mackeldanz, Karol Wyszomirski und Katja Wagenführ für ihre Ratschläge und Unterstützung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein spezielles Dankeschön für Diskussionen und Auflockerung des Arbeitsalltags gilt auch den Damen und Herren des Doktorandenzimmers. Besonders dankbar bin ich meinen Eltern für die Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

Ich möchte meiner Freundin Navina für ihre ausdauernde, geduldige und sehr kompetente Hilfe besonders herzlich danken. Ihr Verständnis für meine Arbeit und ihre Unterstützung ermöglichten mir auch in schwierigen Zeiten den Durchblick zu behalten.

Eigene Publikationen zum Thema

Artikel

Szczepek, M.; Mackeldanz, P.; Moncke-Buchner, E.; Alves, J.; Kruger, D. H. und Reuter, M, (2009): Molecular analysis of restriction endonuclease EcoRII from Escherichia coli reveals precise regulation of its enzymatic activity by autoinhibition, Mol Microbiol (Band 72), Nr. 4, Seite 1011-21

Scheerer, P., Szczepek, M., Spahn, C. M., Kruger, D. H. und Reuter, M. Crystal structure of EcoRII wild-type to 1.9 Å reveals a new Mg²⁺ binding pocket and DNA minor groove interactions. (in Vorbereitung).

Vorträge

Szczepek M, Mackeldanz P, Moncke-Buchner E, Kruger DH, Reuter M, (2008). Probing of the autoinhibition mechanism of restriction endonuclease EcoRII, 19TH EUROPEAN STUDENTS' CONFERENCE, Berlin, Oktober 2008 i

Michal Szczepek, Petra Mackeldanz, Elisabeth Möncke-Buchner, Detlev H. Krüger and Monika Reuter, (2008). Mapping of the critical determinants for accomplishing autoinhibition of restriction endonuclease EcoRII enzyme activity, 3rd Annual Meeting of the MARIE CURIE Research Training Network "DNA Enzymes", Berlin, September 2008

Poster

Li Qiu, Michal Szczepek, Monika Reuter, Edward J. Meehan und Liqing Chen, (2008). Structural Studies of Type IIE Restriktion Endonuklease EcoRII-DNA Complex, American Crystallographic Association Meeting in Knoxville Tennessee , Mai 2008

Michal Szczepek, Christan M. Spahn, Detlev H. Krüger, Monika Reuter, and Patrick Scheerer, (2009). New insights into the mechanism and structure of EcoRII endonuclease, First Joint BER II and BESSY II Users Meeting, Helmholtz-Zentrum, Berlin, November 2009

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Untersuchungen zur Regulation der Enzymaktivität der Restriktionsendonuklease EcoRII durch Autoinhibition“ selbstständig verfasst habe und auch in Teilen keine fremden Arbeiten enthalten sind. Teile dieser Arbeit waren bzw. werden Gegenstand eigener Publikationen. Die verwendeten Hilfsmittel und Literatur habe ich vollständig angegeben.

Berlin, Juli 2010

Michał Szczepek