

Untersuchung der DNA-Spaltung durch die komplexe GTPase

McrBC aus *Escherichia coli* K-12

In-vitro-Experimente mit den Untereinheiten McrB und McrC
sowie Vorstellung eines neuen Modells zur Enzymologie von McrBC

**Untersuchung der DNA-Spaltung
durch die komplexe GTPase McrBC
aus *Escherichia coli* K-12**

***In-vitro*-Experimente mit den Untereinheiten McrB und McrC
sowie Vorstellung eines neuen Modells
zur Enzymologie von McrBC**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Detlef Hartmut Groll

geboren am 13.07.1971 in Uslar (Niedersachsen)

Gießen, 2001

Die vorliegende Dissertation ist eine Abhandlung mit experimentellem Inhalt.

Die Experimente wurden in der Zeit vom 04.11.1996 bis 30.06.2000 am Institut für Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften (FB 08; vormals Fachbereich Biologie, FB 15) der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Rainer Renkawitz
Institut für Genetik des Fachbereichs Biologie (FB 8) der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58
D-35392 Gießen

Referent: Prof. Dr. Alfred Pingoud
Institut für Biochemie des Fachbereichs Biologie (FB 8) der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58
D-35392 Gießen

Korreferent: Prof. Dr. Karl Forchhammer
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Biologie (FB 8)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- UWE PIEPER, THOMAS SCHWEITZER, DETLEF H. GROLL, FRANK-ULRICH GAST
& ALFRED PINGOUD
The GTP-binding Domain of McrB: More Than Just a Variation on a Common Theme?
Journal of Molecular Biology 292 (1999), S. 547 - 556
- UWE PIEPER, THOMAS SCHWEITZER, DETLEF H. GROLL & ALFRED PINGOUD
Defining the Location and Function of Domains of McrB by Deletion Mutagenesis
Biological Chemistry 380 (1999), S. 1225 - 1230

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder dem Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Detlef H. Groll (Gießen a. d. Lahn / Ulm a. d. Donau, Februar 2001)

Life is rather like a tin of sardines,
we are all looking for the key.

Alan Bennett

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	V
2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
3. ANMERKUNGEN ZUR NOMENKLATUR UND SCHREIBWEISE	XII
3.1. DEZIMALTRENnzeICHEN	XII
3.2. SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN	XII
3.3. SYMBOLE FÜR ORGANISCHE BASEN	XII
3.4. PRÄFIXE FÜR EINHEITEN	XIII
3.5. EINHEITEN	XIII
3.6. PUFFERNAMEN	XIV
3.7. ABKÜRZUNGEN	XIV
I. EINLEITUNG	1
1. BAKTERIELLE DNA-METHYLTRANSFERASEN UND RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	2
1.1. TYP I R/M-SYSTEME	3
1.2. TYP II R/M-SYSTEME	7
1.2.1. Typ Iie R/M-Systeme	8
1.2.2. Typ IIs R/M-Systeme	9
1.3. TYP III R/M-SYSTEME	10
1.4. TYP IV R/M-SYSTEME	13
1.5. METHYLIERUNGSABHÄNGIGE RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
1.5.1. Mrr	14
1.5.2. Mcr-Systeme	15
2. DAS KOMPLEXE GTP-ABHÄNGIGE RESTRIKTIONSSYSTEM MCRBC AUS <i>E. COLI</i> K-12	15
2.1. ENTDECKUNG DER MCRBC-RESTRIKTIONS-AKTIVITÄT	15
2.2. GENETISCHE GRUNDLAGEN DES MCRBC RESTRIKTIONSSYSTEMS	17
2.3. STRUKTUR DER MCRBC-PROTEINE	20
2.3.1. McrB	21
2.3.2. McrB _s	24
2.3.3. McrC	25
2.4. DNA-BINDUNG UND -SPALTUNG DURCH DAS MCRBC-RESTRIKTIONSSYSTEM	27
2.4.1. Erkennung von Cytosin-Modifikationen in der DNA	27
2.4.2. Erkennungssequenzen und Erkennungselemente von McrBC	27
2.4.3. DNA-Bindung und -Spaltung	30
2.4.4. GTP-Abhängigkeit der DNA-Spaltung durch McrBC	31
3. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	33

II. MATERIALIEN UND METHODEN	34
1. MATERIALIEN	34
1.1. CHEMIKALIEN	34
1.2. WASSER	34
1.3. ANTIBIOTIKA	35
1.3.1. Ampicillin	35
1.3.2. Chloramphenicol	36
1.4. NÄHRMEDIEN FÜR BAKTERIENKULTUREN	36
1.4.1. LB-Flüssigmedium	37
1.4.2. SOB-Medium	37
1.4.3. SOC-Medium	37
1.4.4. Agar-Festmedien	38
1.5. BAKTERIENSTÄMME	38
1.5.1. TC410	39
1.5.2. TAT2265	39
1.5.3. BL21(DE3)	39
1.6. DNA	40
1.6.1. Plasmide	40
1.6.1.a. Plasmide für Proteinexpression	40
pBN211	41
pBN213	42
pGSTMcrBs	42
pHisMcrBs	43
pBBImcrB	44
1.6.1.b. Substratplasmide	45
pBW201	45
pBW5	47
pMC63	47
pHisVDE Δ Splice	48
1.6.2. Oligodesoxynukleotide	48
1.6.2.a. Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR	49
1.6.2.b. Synthetisch hergestellte Substrat-DNA	54
1.6.3. Größenstandards für DNA-Gele	55
1.7. ENZYME, BSA, MARKER- UND SONSTIGE PROTEINE	56
1.8. RADIOAKTIVE NUKLIDE	56
1.9. PUFFER	57
2. MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN	57
2.1. BAKTERIENKULTUREN	58
2.1.1. Flüssigkulturen	58
2.1.1.a. Flüssigkulturen für Plasmidisolation	59
2.1.1.b. Flüssigkulturen für Proteinaufreinigung	59
2.1.2. Lagerung von Bakterien	60
2.1.2.a. Agarplatten	60
2.1.2.b. Glyzerinkulturen	61

2.1.2.c. Zellpellets	62
2.2. HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	62
2.2.1. Elektrokompente Zellen	62
2.2.2. Kalziumkompetente Zellen	63
3. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	64
3.1. PROTEINE	65
3.1.1. Analytische Protein-Gele und deren Dokumentation	65
3.1.1.a. SDS-PAGE	65
3.1.1.b. Probenvorbereitung	67
Zell-Lysate	67
TCA-Fällung	67
3.1.1.c. Dokumentation von analytischen Protein-Gelen	68
3.1.2. Proteinpräparation aus Bakterien	68
3.1.2.a. Zellaufschluss	68
3.1.2.b. Affinitäts-Chromatografie zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	69
3.1.2.c. Affinitäts-Chromatografie zur Aufreinigung von His ₆ -Fusionsproteinen	71
3.1.2.d. Anionenaustausch-Chromatografie	73
3.1.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	74
3.1.4. Test auf aktives Protein in einer Präparation	75
3.2. DNA	75
3.2.1. DNA-Gele und deren Dokumentation	76
3.2.1.a. Agarose-Gele	76
3.2.1.b. Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele	77
3.2.1.c. <i>Mobility-shift</i> -Gele	78
3.2.1.d. Denaturierende Polyacrylamid-Gele	80
3.2.1.e. Dokumentation von DNA-Gelen	81
3.2.2. PCR	81
3.2.3. DNA-Hybridisierung	83
3.2.4. Aufreinigung von DNA	84
3.2.4.a. Plasmide	84
3.2.4.b. PCR-Produkte	85
3.2.4.c. Präparative Agarose-Gele	86
3.2.4.d. Gelfiltration	86
3.2.4.e. DNA-Fällung aus Lösungen	87
3.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA	88
3.2.6. Enzymatische Manipulation	89
3.2.6.a. DNA-Modifikation	90
Methylierung von DNA	90
Dephosphorylierung von DNA	91
Radioaktive Markierung von DNA	92
3.2.6.b. Restriktionsverdau	93
Analytischer Restriktionsverdau	93
Präparativer Restriktionsverdau	94
3.2.6.c. Ligation	95
3.2.7. DNA-Sequenzierung	96
3.2.8. Transformation	97
3.2.8.a. Elektrotransformation	98

3.2.8.b. Kalziumunterstützte Transformation	99
3.3. RADIOAKTIVITÄT	99
3.3.1. Nachweismethoden	99
3.3.1.a. Elektronische Autoradiografie	100
3.3.1.b. Röntgenfilm	101
3.3.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität	102
3.4. UNTERSUCHUNG DER RESTRIKTIONSENDONUKLEASE MCRBC	103
3.4.1. Thermischer Einfluss auf die Proteinstabilität	103
3.4.2. <i>In-trans</i> -Aktivierung	104
3.4.3. DNA-Bindung	104
3.4.3.a. <i>Mobility-shift</i> -Experimente	104
3.4.3.b. Oberflächen-Plasmonresonanz	105
3.4.3.c. Rasterkraftmikroskopie	110
3.4.4. DNA-Spaltung	111
III. ERGEBNISSE	114
1. PROTEINAUFREINIGUNGEN	114
1.1. INDUKTION DER ÜBEREXPRESSION	114
1.2. AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE	115
1.3. ANIONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE	118
2. THERMISCHER EINFLUSS AUF DIE PROTEINSTABILITÄT	120
3. HERSTELLUNG DER DNA-SUBSTRATE	123
3.1. PLASMIDE	123
3.1.1. pBW201W	124
3.1.2. pMcrSb1	125
3.1.3. pMcrSb2 und pMcrSb3	128
3.2. PLASMID-FRAGMENTE	130
3.2.1. Pf1793-11.10	131
3.3. DNA-HYBRIDISIERUNG	133
3.3.1. Sb61-11.11	134
3.3.2. Sb128-11.11	136
3.4. PCR-PRODUKTE	136
3.4.1. Sb73-10.01.00	137
3.4.2. DNA der Sb82-Gruppe	138
3.4.2.a. Sb82a-00.00	138
3.4.2.b. Sb82a-10.01	138
3.4.2.c. Sb82b-00.00	139
3.4.2.d. Sb82b-10.01	139
3.4.3. DNA der Sb99-Gruppe	140
3.4.3.a. Sb99-00.00	141
3.4.3.b. Sb99-20.02	141
3.4.4. DNA der Sb128-Gruppe	141

3.4.4.a. Sb128-00.00	142
3.4.4.b. Sb128-00.01	142
3.4.4.c. Sb128-10.00	142
3.4.4.d. Sb128-10.01	143
3.4.5. DNA der Sb157-Gruppe	143
3.4.5.a. Sb157-00.00	144
3.4.5.b. Sb157-01.01	144
3.4.5.c. Sb157-01.Eco	145
3.4.5.d. Sb157-10.01	145
3.4.5.e. Sb157-10.10	145
3.4.5.f. Sb157-10.Eco	145
3.4.6. Sb173	146
3.4.7. DNA der Sb234-Gruppe	146
3.4.7.a. Sb234a-11.11	147
3.4.7.b. Sb234b-11.11	147
3.4.8. Sb637-00.10.01.01	147
4. UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-BINDUNG	148
4.1. GELRETARDATIONSEXPERIMENTE	149
4.1.1. Sb61-11.11	150
4.1.2. Sb128-DNA	152
4.2. RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	152
4.3. UNTERSUCHUNGEN MIT BIACORE-INSTRUMENTEN	155
4.3.1. McrB ₁₋₁₆₂	156
4.3.2. McrB	159
4.3.3. McrC	163
4.3.4. McrBC	164
5. UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-SPALTUNG	166
5.1.1. Sb73-DNA	167
5.2. PLASMIDE	169
5.2.1. pBW201	169
5.2.1.a. Spaltung von zirkulärem pBW201	171
5.2.1.b. Spaltung von linearem pBW201	174
5.2.2. pBW201W	180
5.2.3. pMcrSb1	183
5.2.4. pMcrSb2 und pMcrSb3	184
5.3. PLASMID-FRAGMENTE	186
5.3.1. Größere Plasmidfragmente	188
5.3.2. Pf430	189
5.3.3. Pf740	190
5.3.4. Pf810	191
5.3.5. Pf1193	192
5.4. PCR-PRODUKTE UND OLIGODESOXYNUKLEOTIDE	192
5.4.1. DNA der Gruppen Sb82 und Sb99	193

5.4.2. Sb61-11.11	194
5.4.3. Sb637-00.10.01.01	197
5.4.4. Sb157-DNA	198
5.4.4.a. Generierung einer Translokationsbarriere	203
5.4.5. Sb128-DNA	205
5.5. <i>IN-TRANS</i>-AKTIVIERUNG	208
IV. DISKUSSION	210
<hr/>	
1. UNTEREINHEITEN UND DOMÄNEN DES MCRBC-SYSTEMS	211
2. INTERAKTION DES MCRBC-SYSTEMS MIT DNA	213
3. ANFORDERUNGEN DES MCRBC-SYSTEMS AN DAS DNA-SUBSTRAT UND EINFLUSS DER DNA AUF DIE RESTRIKTIONSAKTIVITÄT DES MCRBC-SYSTEMS	219
4. DAS MCRBC-SYSTEM UND ANDERE PROTEINSYSTEME - EIN VERGLEICH	225
5. RESTRIKTION VON DNA DURCH DAS MCRBC-SYSTEM	231
5.1. DNA-SPALTUNG DURCH MCRBC: EIN NEUES MODELL	236
6. EVOLUTION DES MCRBC-SYSTEMS	240
V. ZUSAMMENFASSUNG	243
<hr/>	
VI. QUELLEN- UND LITERATURVERZEICHNIS	246
<hr/>	
1. VERWENDETE DATENBANKEN	246
1.1. NCBI, <i>GENBANK</i>	246
1.2. SWISS-PROT	247
2. LITERATURVERZEICHNIS	247
VII. ANHANG	274
<hr/>	
1. ORFs DES <i>MCRBC</i>-OPERONS UND PRIMÄRSTRUKTUREN DER GENPRODUKTE	274
2. PLASMID-SEQUENZEN	277
2.1. pBN211	277
2.2. pBN213	280
2.3. PBW201	282
2.4. pHisMCRBs	284
2.5. pMC63	286
2.6. pMCRsB1	287
3. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	289
4. DANKSAGUNG	290

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
01. Schematische Darstellung der <i>immigration control region</i> aus <i>E. coli</i> K-12.	20
02. Beispiele für hemi- und vollmethylierte DNA-Sequenzen.	28
03. Entstehung von McrBC-Erkennungssequenzen durch DNA-Methylierung.	29
04. Lokalisation von 5-Methylcytosin im Substratplasmid pBW201.	46
05. Schemazeichnung zur Messung der Oberflächen-Plasmonresonanz mit einem BIAcore-Instrument.	106
06. Schemazeichnung zur Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.	109
07. Einfluss der Inkubation von McrB und McrB ₁₋₁₇₀ bei 37 °C auf das DNA-Bindungsvermögen der Proteine.	121
08. Verteilung der Methylierungspositionen von <i>M.BsuFI</i> in pBW201 und pMcrSb1.	128
09. Lokalisation von 5-Methylcytosin im Plasmidfragment Pf1793-11.10.	132
10. Spezifische Bindung unterschiedlicher Varianten der Untereinheit McrB an Substrat- DNA Sb61-11.11.	151
11. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der DNA-Bindung durch McrB und McrBC. ...	155
12. Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen DNA-Bindung durch McrB ₁₋₁₆₂	157
13. Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen DNA-Bindung durch McrB.	159
14. Bildung von McrBC-Komplexen an unterschiedlich methylierter DNA.	164
15. Abstand der McrBC-Erkennungselemente in dem Substratplasmid pBW201.	170
16. Spaltung von zirkulärem Plasmid pBW201 durch die Restriktionsendonuklease McrBC.	173
17. Spaltung von <i>AvaI</i> -linearisiertem Plasmid pBW201 durch die Restriktionsendonuklease McrBC.	176
18. Tabelle zur Berechnung aller möglichen Fragmentgrößen aus Plasmidsplaltungen an McrBC-Erkennungssequenzen am Substratbeispiel pBW201 · <i>AvaI</i>	179
19. Lokalisation von Abschnitten in pBW201 bzw. in pMcrSb2, die in dieser Arbeit als isolierte Fragmente untersucht wurden.	187
20. Spaltung von Sb157-01.01 durch McrBC.	200
21. Schnittpositionen des McrBC-Systems im unteren DNA-Strang von Sb157-01.01.	201
22. Schnittpositionen des McrBC-Systems im Doppelstrang von Sb157-DNA.	202
23. Spaltung von Sb128-10.01 durch McrBC.	206
24. Schnittpositionen des McrBC-Systems im unteren DNA-Strang von Sb128-10.01.	207

3. Anmerkungen zur Nomenklatur und Schreibweise

3.1. Dezimaltrennzeichen

Als Dezimaltrennzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt (.) verwendet.

3.2. Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
x		nicht definierte Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin

Ein Aminosäurenaustausch an einer bestimmten Position in der Primärstruktur eines Proteins wird nach dem international üblichen Schema *ursprüngliche Aminosäure, Positionsnummer, neue Aminosäure* unter Verwendung des Ein-Buchstaben-Codes abgekürzt, z. B. A100C für einen Tausch von Alanin an Position 100 nach Cystein.

3.3. Symbole für organische Basen

A	Adenin
Ä	Adenin als organische Base eines Nukleotids, das am 5'-Ende einen Biotinrest trägt
^m A	Methyladenin
^m 6A	N ⁶ -Methyladenin

C	Cytosin
Ç	Cytosin als organische Base eines Nukleotids, das am 5'-Ende einen Biotinrest trägt
^m C	Methylcytosin (auch Hydroxymethylcytosin)
⁴ C	N ⁴ -Methylcytosin
⁵ C	5-Methylcytosin
hm ⁵ C	5-Hydroxy-Methylcytosin
G	Guanin
M	Methylcytosin (auch Hydroxymethylcytosin) <i>Hinweis:</i> Im international üblichen Einbuchstabencode der Nukleotidbasen steht <i>M</i> für die Basen Adenin oder Cytosin. Da eine solche Abkürzung in dieser Arbeit nicht verwendet wird, wurde der Buchstabe <i>M</i> für eine leicht einprägsame Einbuchstaben-Abkürzung von <i>Methylcytosin</i> ausgewählt.
N	nicht definierte Base
R	Purin (Adenin oder Guanin)
T	Thymin
W	Adenin oder Thymin
Y	Pyrimidin (Cytosin oder Thymin)

Spaltpositionen von Restriktionsendonukleasen in einer in 5'- zu 3'-Richtung angegebenen Basensequenz werden durch einem Pfeil (↓) markiert.

3.4. Präfixe für Einheiten

k	Kilo	(10 ³ -fach)
m	Milli	(10 ⁻³ -fach)
μ	Mikro	(10 ⁻⁶ -fach)
n	Nano	(10 ⁻⁹ -fach)
p	Pico	(10 ⁻¹² -fach)

3.5. Einheiten

A	Ampere	physikalische Basiseinheit der Stromstärke
bar	Bar	besonderer Name für 10 ⁵ Pascal, 1 bar = 10 ⁵ Pa (Pascal ist die abgeleitete physikalische Einheit des Druckes, 1 Pa = 1 kg · m ⁻¹ · s ⁻²)
Bq	Becquerel	abgeleitete physikalische Einheit der radiologischen Aktivität, 1 Bq = 1 s ⁻¹
°C	Grad Celsius	physikalische Basiseinheit der Temperatur (die Temperatureinheit °C ist als besonderer Name für das Kelvin, K, zu betrachten)
<i>cpm</i>	<i>counts per minute</i>	Angabe der gemessenen radioaktiven Zerfallsrate, 1 cpm = 1 radioaktiver Zerfall · min ⁻¹
d	Dalton	atomphysikalische Einheit der Masse (atomare Masseneinheit), 1 d = 1.66 · 10 ⁻²⁴ g
g	Gramm	abgeleitete physikalische Einheit der Masse, 1 g = 10 ⁻³ kg
h	Stunde	abgeleitete Einheit der Zeit, 1 h = 3600 s
Hz	Hertz	abgeleitete Einheit der Frequenz, 1 Hz = 1 s ⁻¹
l	Liter	abgeleitete physikalische Einheit des Volumens, 1 l = 10 ⁻³ m ³

m	Meter	physikalische Basiseinheit der Länge
M	molar	abgeleitete physikalische Einheit der Konzentration, $1 \text{ M} = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
min	Minuten	abgeleitete Einheit der Zeit, $1 \text{ min} = 60 \text{ s}$
mol	Mol	physikalische Basiseinheit der Stoffmenge (Teilchenanzahl $6.0221 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, AVOGADRO-Konstante)
<i>rpm</i>	<i>rotations per minute</i>	Angabe der Umdrehungsgeschwindigkeit, $1 \text{ rpm} = 1 \text{ Umdrehung} \cdot \text{min}^{-1}$
RU	<i>resonance units</i>	Einheit der Änderung von Oberflächen-Konzentration in BIACORE-Sensorchips (eine Änderung des Resonanzsignals von 1000 RU bedeutet eine Änderung der Konzentration auf der Oberfläche des Sensorchips von $1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$)
s	Sekunde	physikalische Basiseinheit der Zeit
u	<i>units</i>	Angabe der enzymatischen Aktivität nach der Definition für das jeweilige Enzym nach Herstellerangaben
V	Volt	abgeleitete physikalische Einheit der elektrischen Spannung, $1 \text{ V} = 1 \text{ W} \cdot \text{A}^{-1}$
W	Watt	abgeleitete physikalische Einheit der Leistung, $1 \text{ W} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$

3.6. Puffernamen

Mit Ausnahme der Elektrophorese-Elektrodenpuffer und der Gel-Auftragspuffer resultieren Abkürzungen von Pufferbezeichnungen aus der Produktbezeichnung der Herstellerfirma oder aus der Art der verwendeten Puffersubstanz sowie der im Puffer enthaltenen Substanzen. Dabei bedeuten:

A	= Puffer enthält Zusatz von Essigsäure (Azetat)
B	= Puffer enthält Zusatz von Borsäure
D	= Puffer enthält Zusatz von DTE oder DTT
E	= Puffer enthält Zusatz von EDTA
Gly	= Puffer enthält Zusatz von Glycerin
GTP	= Puffer enthält Zusatz von GTP
H	= Puffersubstanz ist HEPES
Im.	= Puffer enthält Zusatz von Imidazol
M	= Puffer enthält Zusatz von Magnesiumionen (z. B. in Form von MgCl_2)
P	= Puffer enthält Zusatz von Phosphorsäure
S	= Puffer enthält Zusatz von NaCl (<i>sodium chloride</i>)
T	= Puffersubstanz ist Tris

3.7. Abkürzungen

$\epsilon^{x \text{ nm}}$	molarer Extinktionskoeffizient bei einer Lichtwellenlänge von $x \text{ nm}$
AA	Acrylamid
AAP	Agarosegel-Auftragspuffer
Ac	Acetat
AFM	Atomkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n) oder Aminosäurerest(e)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaar(e)
BME	β -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
<i>c</i>	Konzentration
Cam	Chloramphenicol
d	Desoxy-
Da	Dalton (s. Einheitszeichen <i>d</i>)
dd	Didesoxy-
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (als Dinatriumsalz)
EMBL <i>et al.</i>	Nukleotidsequenz-Datenbank des <i>European Molecular Biology Laboratory</i> und andere (<i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAP	Formamid-Auftragspuffer
FC	Flusszelle (<i>flow cell</i> ; Messzelle des BIAcore-Instruments)
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
Gly	Glyzerin
GSH	Glutathion (mit reduzierter Form der Sulfhydrylgruppe)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
<i>ID</i>	Zuordnungsziffer (<i>identity number</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITP	Inosin-5'-Triphosphat
K_{ass}	Bindungskonstante (Gleichgewichts-Assoziationskonstante)
kbp	10 ³ Basenpaare
k_{cat}	Katalyse-Konstante (Umsatzzahl, <i>turnover number</i>)
K_{diss}	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
K_{M}	<i>Michaelis</i> Konstante
LAP	Laemmli-Gel-Auftragspuffer (Probenauftragspuffer für proteinanalytische Gele nach U. K. Laemmli, vgl. S. 57)
LB	Nährmedium nach S. E. Luria & G. Bertani (vgl. S. 37)
lin.	linearisierte Form (bei Plasmiden)
<i>M</i>	Molekulargewicht (Molmasse)
max.	maximal

MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mind.	mindestens
MOPS	3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure
n. b.	nicht bestimmt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda, USA (s. S. 246)
NIH	<i>National Institutes of Health</i> , Bethesda, USA (s. S. 246)
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriacetat
NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat (organ. Base nicht näher spezifiziert)
oc.	relaxierte Form von Plasmiden (<i>open circular</i>)
OD ^{x nm}	optische Dichte bei einer Lichtwellenlänge von x nm
Oligo	Oligodesoxynukleotid
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
P _i	anorganisches Orthophosphat
PNK	Polynukleotid-Kinase
Pos.	Position (Positionsnummer einer Base oder eines Basenpaares in einem DNA-Strang)
<i>red.</i>	reduzierte Form
R/M-System	Restriktions-/Modifikationssystem
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SAP	Alkalische Phosphatase des Shrimps (<i>shrimps alkaline phosphatase</i>)
sc.	überspiralisierte Form von Plasmiden (<i>super coiled</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SFM	Rasterkraftmikroskop (<i>scanning force microscope</i>)
SIB	Schweizerisches Institut für Bioinformatik (Genf, Schweiz)
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
STM	Raster-Tunnelmikroskop (<i>scanning tunneling microscope</i>)
<i>t</i>	Zeit (<i>time</i>)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
<i>tag</i>	keine Abkürzung; <i>engl.</i> : Schwanz, Anhängsel
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
URL	<i>Uniform Resource Locator</i> (Internet-Adresse)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (bei prozentualen Konzentrationsangaben)
Vol.	Volumenteile
<i>wt</i>	Wildtyp (Protein mit der natürlich vorkommenden Primärstruktur)
w/v	Gewicht pro Volumen (bei prozentualen Konzentrationsangaben)
WWW	<i>World Wide Web</i> (Teil des Internets, in dem Texte, Bilder, Video- und Tondateien in Form von Seiten angeordnet sind)
XTP	Xanthosin-5'-Triphosphat

I. EINLEITUNG

Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) dient bei allen Lebewesen (Pro- und Eukaryoten) sowie bei DNA-Viren universell als Träger der genetischen Information (Avery *et al.*, 1944; Hershey & Chase, 1952). Für das Leben und Überleben der Organismen ist es sehr bedeutsam, eigene DNA von fremder unterscheiden zu können und die Vervielfältigung der eigenen DNA, mit Ausnahme von genetisch geförderten DNA-Veränderungen, möglichst fehlerfrei durchzuführen (Dickerson & Geis, 1969; Wilson *et al.*, 1977; Wilson *et al.*, 1987). Abgesehen von den relativ kleinen Genomen einiger Pflanzen-, Tier- oder Bakterienviren (z. B. der Bakteriophagen Φ X174 und M13), die aus einem ringförmig geschlossenen DNA-Einzelstrang bestehen, liegt die DNA stets als Doppelstrang vor (Watson & Crick, 1953a, b) und enthält lediglich temporär einzelsträngige Abschnitte bei Vorgängen wie Replikation, Transkription, Rekombination und Reparaturprozessen.

Bakterien nutzen ein für den jeweiligen Bakterienstamm spezifisches Modifikationsmuster in den Basen der DNA, um einen zelleigenen DNA-Doppelstrang als der Zelle zugehörig (Arber & Dussoix, 1962) und als richtige Vorlage für postreplikative und andere Reparaturprozesse zu kennzeichnen (Modrich, 1987; Radman & Wagner, 1988; Modrich, 1991; Friedberg *et al.*, 1995). Das Muster der bakterienspezifischen Modifikationen in den Basen der DNA wird durch bakterieneigene DNA-Methyltransferasen gebildet (Noyer-Weidner & Trautner, 1993). Die Methyltransferasen sind Bestandteil einer komplexen Enzymmaschinerie, welche zelleigene DNA von fremder zu unterscheiden vermag und fremde DNA durch endonukleolytische Spaltung zerstört. Die Zerstörung fremder DNA, z. B. nach einem Befall der Bakterien durch Phagen, verhindert die Vermehrung und das Übersetzen der in die Bakterienzellen eingedrungenen viralen DNA und schützt somit die Bakterien vor Phageninfektionen. Da Phagen, deren DNA in bestimmten Bakterienkolonien aufgrund einer endonukleolytischen Spaltung inaktiviert werden kann, solche Kolonien nur mit einer sehr geringen Effizienz infizieren können und ihr Wachstum in diesen Kolonien somit eingeschränkt (*restringiert*) ist, wurde die die Bakterien schützende Aktivität historisch als *Restriktionsaktivität* bezeichnet (Luria & Human, 1952; Bertani & Weigle, 1953). Somit heißen die für diese Aktivität verantwortlichen Enzyme Restriktionsendonukleasen.

1. Bakterielle DNA-Methyltransferasen und Restriktionsendonukleasen

Das von Bakterien verwendete System zur Markierung zelleigener DNA, das für die Steuerung von DNA-Reparaturprozessen und für die Eliminierung von in die Zelle eingedrungener Fremd-DNA genutzt wird, basiert auf enzymatischen Methyltransferase- und Endonukleaseaktivitäten. Neben der Beteiligung bei DNA-Reparaturprozessen kommt diesen Enzymaktivitäten eine Bedeutung in der Wirkung als primitives Immunsystem in Prokaryoten zu, da in die Bakterienzelle eindringende Fremd-DNA durch hydrolytische Spaltung inaktiviert werden kann.

DNA-Methyltransferasen sind Enzyme, die bestimmte Basensequenzen in der DNA erkennen und diese durch Übertragung von Methylgruppen auf bestimmte Positionen der Basen modifizieren, wobei das Kosubstrat S-Adenosylmethionin Spender der Methylgruppe ist. Die Methyltransferasen unterscheiden sich in ihrer DNA-Erkennungssequenz, in der Art der zu modifizierenden Base, wobei entweder A oder C methyliert werden (Methylierungen an G oder T sind nicht bekannt), sowie in der Position der zu methylierenden Zielbase innerhalb der Erkennungssequenz (beispielsweise erkennt die Methyltransferase *M.MspI* aus *Moraxella* species die DNA-Sequenz 5'-CCGG-3', methyliert aber nur das erste C dieser Sequenz). Je nach der Position innerhalb der Zielbase, an der die Methylierungsreaktion durch die Methyltransferase stattfindet, werden die DNA-Methyltransferasen in drei Typengruppen eingeteilt (Wilson & Murray, 1991; Anderson, 1993): C-Methyltransferasen methylieren Cytosinreste entweder an der C5-Position (m⁵C-Methyltransferasen) oder an der exozyklischen N⁴-Position (m⁴C-Methyltransferasen), A-Methyltransferasen methylieren Adeninreste nur an der ebenfalls exozyklischen N⁶-Position (m⁶A-Methyltransferasen).

Die durch eine DNA-Methyltransferase erzeugten Modifikationen schützen oftmals zelleigene DNA vor dem Abbau durch die Restriktionsaktivität einer zelleigenen Endonuklease, die nur DNA-Sequenzen erkennen kann, deren Basen an den Zielpositionen der zur Endonuklease komplementären Methyltransferase nicht methyliert sind. Derartige Methyltransferasen bilden mit den durch ihre Methylierungsaktivität kontrollierten Endonukleasen sogenannte Restriktions-/Modifikationssysteme (R/M-Systeme), wobei in der Regel das Restriktionsenzym und die ihm zugehörige Methyltransferase die gleiche DNA-Erkennungssequenz besitzen. R/M-Systeme sind unter Prokaryoten weit verbreitet (Wilson &

Murray, 1991), es sind heute weit über 3000 Restriktionsenzyme mit über 200 verschiedenen Spezifitäten bekannt (Wilson, 1991; Bickle & Krüger, 1993; Roberts & Macelis, 2001).

Die meisten R/M-Systeme können nach ihren Eigenschaften bestimmten Typengruppen zugeordnet werden, die die Enzyme nach Art ihrer Untereinheiten, deren Zusammensetzung im aktiven Enzymkomplex, beteiligten Kofaktoren, Art der Erkennungssequenz und dem enzymatischen Reaktionsmechanismus beschreiben. Vier große Klassen und diverse Unterklassen sind heute definiert (Yuan, 1981; Janulaitis *et al.*, 1992a), die nachfolgend vorgestellt werden.

1.1. Typ I R/M-Systeme

Das in dieser Arbeit untersuchte Restriktionssystem McrBC besitzt in vielerlei Hinsicht große Ähnlichkeiten mit den Enzymen der Typ I Restriktions-/Modifikationssysteme. Aus diesem Grunde sollen die Typ I Enzyme an dieser Stelle etwas detaillierter vorgestellt werden, obwohl das McrBC-System durch bestehende Unterschiede eindeutig nicht dieser Typengruppe zuzuordnen ist.

Bei Typ I Restriktions-/Modifikationssystemen sind sowohl die Methyltransferase- als auch die Restriktionsendonuklease-Aktivität des Systems in einem bifunktionellen Enzymkomplex vereinigt, der aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist (Meselson & Yuan, 1968; Eskin & Linn, 1972a; Suri *et al.*, 1984; Price *et al.*, 1987). Diese drei Untereinheiten werden durch die *host specificity-determining* Gene (*hsd*) codiert (Sain & Murray, 1980) und besitzen jeweils eine klar definierte Funktion.

Die S-Untereinheit (Spezifitätsuntereinheit HsdS, codiert durch *hsdS*) kommt im aktiven Enzymkomplex einmal vor und erkennt und bindet eine für das jeweilige Enzymsystem spezifische DNA-Sequenz (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Arber & Linn, 1969; Powell *et al.*, 1998). Als Erkennungssequenzen fungieren nicht-palindrome DNA-Sequenzen mit einer Länge von etwa 15 Basenpaaren, die einen zentralen Abschnitt einer nicht definierten Basensequenz enthalten. Die Erkennungssequenz ist also zweiteilig, jeder Teil wird durch eine von zwei getrennten Domänen der HsdS-Untereinheit gebunden (Fuller-Pace *et al.*, 1984; Gubler *et al.*, 1992).

Die M-Untereinheit (Modifikationsuntereinheit HsdM, codiert durch *hsdM*) besitzt eine m⁶A-Methyltransferaseaktivität und kann eine unmethylierte oder hemimethylierte DNA-Erkennungssequenz an spezifischen Positionen methylieren, wenn S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl donor zur Verfügung steht (Burckhardt *et al.*, 1981; Willcock *et al.*, 1994).

Im aktiven Enzymkomplex sind zwei M-Untereinheiten vorhanden. Ein Trimer aus zwei M- und einer S- Untereinheit (M_2S) ist eine funktionelle Methyltransferase (Borck *et al.*, 1976; Taylor *et al.*, 1992; Dryden *et al.*, 1993; Janscak & Bickle, 1998), besitzt aber keine Restriktionsaktivität.

Die endonukleolytische Spaltaktivität ist in der R-Untereinheit (Restriktionsuntereinheit HsdR, codiert durch *hsdR*) lokalisiert. Zwei R-Untereinheiten bilden mit dem Methyltransferase-Trimer (M_2S) einen DNA-spaltaktiven Enzymkomplex, so dass dieser als Heteropentamer mit der Zusammensetzung R_2M_2S vorliegt (Dryden *et al.*, 1997; Janscak *et al.*, 1998). Eine endonukleolytische Spaltung von DNA ist nur mit Hilfe zweiwertiger Metallionen (Mg^{2+}) und S-Adenosylmethionin, die beide als Kofaktor für die Spaltung dienen, möglich. Dabei ist die SAM-bindende Untereinheit nicht HsdR, sondern HsdM.

In der pentameren Zusammensetzung des Enzymkomplexes (R_2M_2S) entscheidet der Methylierungsstatus der Erkennungssequenz über die Art der enzymatischen Aktivität, die das Typ I R/M-System hervorbringt: Vollmethylierte Erkennungssequenzen induzieren keine enzymatische Aktivität, während hemimethylierte Erkennungssequenzen, wie sie nach Replikation vollmethylierter DNA vorliegen, durch die Methyltransferaseaktivität des Typ I R/M-Systems vollständig methyliert werden. Nur unmethylierte Erkennungssequenzen definieren die vorliegende DNA als ein Substrat für die Restriktionsaktivität des Typ I Enzyms.

Die Untereinheit HsdR besitzt neben der endonukleolytischen DNA-Spaltaktivität noch andere Eigenschaften, die weitere für Typ I R/M-Systeme charakteristische Merkmale darstellen. So erfolgt die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats nicht innerhalb der Erkennungssequenz, sondern 40 bp (Dreier *et al.*, 1996) bis mehrere tausend Basenpaare davon entfernt an einer Position, die nicht durch eine Basensequenz oder durch die Entfernung zu der Erkennungssequenz definiert ist (Rosamond *et al.*, 1979; Yuan *et al.*, 1980a; Endlich & Linn, 1985; Szczelkun *et al.*, 1996). Zu dieser Stelle gelangt der Enzymkomplex durch DNA-Translokation, während der die Bindung der S-Untereinheit an die Erkennungssequenz nicht gelöst wird (Bickle *et al.*, 1978). Die für die DNA-Translokation verantwortlichen Untereinheiten sind die beiden R-Untereinheiten des Enzymkomplexes. Sie sind so angeordnet, dass der an die Erkennungssequenz gebundene Enzymkomplex die DNA in beide Richtungen (Yuan *et al.*, 1980a; Studier & Bandyopadhyay, 1988; Dreier *et al.*, 1996; Szczelkun *et al.*, 1997) unter Ausbildung sekundärer DNA-Kontakte translozieren kann. Diese DNA-Translokation führt zur Bildung von DNA-loops, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar gemacht (Bickle *et*

al., 1978; Rosamund *et al.*, 1979; Yuan *et al.*, 1980a; Endlich & Linn, 1985) und in Aufnahmen der *atomic-force*-Mikroskopie im zeitlichen Verlauf sogar beobachtet werden können (Ellis *et al.*, 1999).

Entscheidend für das Auslösen der hydrolytischen DNA-Spaltaktivität von HsdR im Verlauf der DNA-Translokation ist nicht eine definierte Basensequenz in der DNA, sondern eine Barriere, die das Fortschreiten der DNA-Translokation durch HsdR verhindert (Janscak *et al.*, 1999). Nicht nur ein zweiter, in Gegenrichtung translozierender Typ I Enzymkomplex kann eine solche Translokationsbarriere darstellen (Studier & Bandyopadhyay, 1988; Dreier *et al.*, 1996), sondern auch andere an die DNA gebundene Proteine, wie z. B. der Repressor Lac (Dreier *et al.*, 1996) oder auch einige DNA-Strukturen, wie z. B. *Holliday junctions* (Janscak *et al.*, 1999). Für eine Spaltung beider DNA-Stränge ist also nicht eine früher vermutete Interaktion zweier Typ I Enzymkomplexe notwendig (Studier & Bandyopadhyay, 1988), vielmehr vermag eine R-Untereinheit des Typ I Enzymkomplexes beide DNA-Stränge zu spalten (Janscak *et al.*, 1999). Auch von anderen Restriktionsenzymen ist bekannt, dass eine einzige Endonuklease-Domäne beide DNA-Stränge zu spalten vermag, z. B. von der ebenfalls aus mehreren Untereinheiten bestehenden Endonuklease *BcgI* (Kong *et al.*, 1993; Kong, 1998).

Ohne die Wirkung einer Translokationsbarriere wird jedoch keine DNA-Spaltreaktion durch HsdR ausgelöst. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit nur einer einzigen Erkennungssequenz auf linearer DNA zwar eine DNA-Bindung und auch eine DNA-Translokation durch das Typ I Enzym induzieren kann, aber zu keiner DNA-Hydrolyse führt (Rosamond *et al.*, 1979; Dreier *et al.*, 1996). Lediglich ein starker Überschuss an Enzym gegenüber linearer DNA mit singulärer Erkennungssequenz kann eine schwache DNA-Spaltaktivität auf einem solchen Substrat bewirken (Murray *et al.*, 1973; Szczelkun *et al.*, 1996), was auf eine Behinderung der DNA-Translokation durch einen weiteren, unspezifisch an die DNA gebundenen Enzymkomplex zurückzuführen ist (Studier & Bandyopadhyay, 1988).

Im Gegensatz zu der Situation bei linearer DNA reicht bei zirkulärer DNA die Anwesenheit einer einzigen Erkennungssequenz aus, um eine Spaltung dieses DNA-Substrates durch den Typ I Enzymkomplex hervorzurufen (Rosamond *et al.*, 1979; Dreier *et al.*, 1996; Janscak *et al.*, 1996). Bei einem zirkulär geschlossenen DNA-Substrat kann eine dem Verlauf der kleinen oder großen DNA-Grube folgende Translokation durch ein Protein, das an einer Stelle fest an die DNA gebunden ist, zu einer Rotation der DNA um ihre helikale Achse führen. Dies bedeutet eine Zunahme der DNA-Überwindung (Generierung von positiven *supercoils*) in dem Strang, den das Protein heranzuziehen versucht, sowie eine Unterwindung der DNA

(Generierung von negativen *supercoils*) in dem Strang, der das Protein bereits passierte (Ostrander *et al.*, 1990). Als Auslöser für die DNA-Spaltreaktion durch ein Typ I R/M-System an einem zirkulären DNA-Substrat mit singulärer Erkennungssequenz für das Typ I System wurden zunächst die nach diesem Modell resultierenden Änderungen in der DNA-Topologie diskutiert, die letztlich eine weitere DNA-Translokation verhindern und somit wie eine Translokationsbarriere wirken sollten (Szczelkun *et al.*, 1996). Später zeigten jedoch Untersuchungen an zirkulären DNA-Substraten mit unterschiedlichen Windungszahlen, dass Typ I R/M-Systeme DNA-Translokation unabhängig von dem Topologie-Status der DNA durchführen können (Janscak *et al.*, 1999), was gegen das Auslösen der DNA-Spaltreaktion durch Zunahme der torsionalen Spannung in der DNA spricht.

Die DNA-Translokation erfolgt unter Hydrolyse von ATP durch die R-Untereinheiten. Typ I R/M-Systeme sind also in Bezug auf die Restriktionsaktivität ATP-abhängige Enzyme. Die Abhängigkeit der DNA-Spaltung von einer ATP-Hydrolyse ist, verglichen mit anderen Restriktionsenzymen ungewöhnlich. Zwar sind auch die Mitglieder einer anderen Typengruppe von R/M-Systemen (Typ III Systeme) in Bezug auf ihre Restriktionsaktivität von der ATP-Hydrolyse abhängig, aber beide Gruppen beinhalten im Vergleich zu der Gesamtzahl an bekannten Restriktionsaktivitäten jeweils nur eine sehr geringe Anzahl an Vertretern.

Für ein Typ I R/M-System ist die ATP-Hydrolyse für die Hervorbringung einer Restriktionsaktivität zwar essenziell, wird aber nicht für die Phosphodiester-Hydrolyse an sich benötigt, sondern für die der DNA-Spaltung vorangehende DNA-Translokation. Dabei ist der ATP-Umsatz so groß, dass ATP nicht als Kofaktor, sondern als Kosubstrat bezeichnet werden muss: 1 pmol *EcoK* hydrolysiert 10^4 pmol ATP pro Minute (Reiser & Yuan, 1977). Interessanterweise ist die ATP-Hydrolyseaktivität nach erfolgter DNA-Spaltung noch längere Zeit messbar (Eskin & Linn, 1972b; Yuan *et al.*, 1972), wobei der Enzymkomplex an die Erkennungssequenz gebunden bleibt (Bickle *et al.*, 1978; Rosamond *et al.*, 1979; Yuan *et al.*, 1980a). Sofern es sich bei der nach der DNA-Spaltung fortsetzenden ATP-Hydrolyse nicht um ein Laborartefakt handelt, ist die Bedeutung dieses Phänomens unklar. Bickle (1982) deutet in sie eine "altruistische" Funktion zur Eliminierung phageninfizierter Zellen aus Bakterienkolonien - dies würde bedeuten, dass sich eine von einem Phagen befallene Bakterienzelle selbst vernichtet, obwohl es ihr zuvor gelungen ist, die eingedrungene Phagen-DNA zu zerstören.

Der Mechanismus der DNA-Translokation durch Typ I Enzyme ist nicht im Detail bekannt. Auffallend ist das Vorhandensein von sieben konservierten Aminosäuresequenzmotiven

(DEAD-*box*-Motive) in der HsdR-Untereinheit, die typisch für Proteine mit ATP-abhängiger DNA-Translokation bzw. Helikase-Aktivitäten (Vertreter der Helikase Superfamilien I und II) sind (Gorbalenya & Koonin, 1991; Murray *et al.*, 1993; Bird *et al.*, 1998). Dies läßt einen Helikase-Mechanismus der DNA-Translokation vermuten. Mutageneseexperimente in *hdsR* zeigten, dass diese konservierten Sequenzen zwar nicht für DNA-Bindung und ATP-induzierte Konformationsänderungen, aber sowohl für DNA-Restriktionsaktivität *in vivo* und für ATP-Hydrolyse als auch für die Hervorbringung einer DNA-Spaltung *in vitro* essenziell sind (Webb *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1998).

Die vorliegenden Befunde lassen vermuten, dass Typ I Restriktionssysteme die DNA-Translokation ohne Änderung der Überwindungszahl des zu ziehenden und des gezogenen DNA-Stranges durchführen, was gegen ein Modell des Translokationsvorgangs spricht, bei dem sich der Enzymkomplex entlang einer Furche des *ds*DNA-Substrats bewegt (Janscak *et al.*, 1999). Bildung von DNA-*loops* ohne Änderung in der Zahl der DNA-Überwindungen ist auch von der DNA-Translokation eines anderen ebenfalls ATP-abhängigen Enzyms bekannt: von dem zu einem methylierungsabhängigen DNA-Reparatursystem gehörenden MutS-Dimer aus *E. coli* (Allen *et al.*, 1997).

Die Gruppe der Typ I R/M-Systeme wird in weitere vier Untergruppen (Typ IA, IB, IC und ID) eingeteilt, wobei die Zuordnung der Enzymsysteme in eine Untergruppe auf Experimenten mit DNA-Hybridisierung, Antikörper-Kreuzreaktion und Untereinheiten-Komplementation basiert (Murray *et al.*, 1982; Price *et al.*, 1987). Zwischen den Mitgliedern einer Untergruppe sind die jeweiligen Untereinheiten des Enzymsystems funktionell austauschbar, jedoch nicht zwischen den Vertretern verschiedener Untergruppen. Typ I R/M-Systeme wurden bis jetzt fast ausschließlich nur bei Vertretern der *Enterobacteriaceae*, einer Gruppe fakultativ anaerober gram-negativer Eubakterien, zu denen auch *E. coli* gehört, gefunden. Insgesamt sind 19 verschiedene Spezifitäten von Typ I R/M-Systemen bekannt (Roberts & Macelis, 1999).

1.2. Typ II R/M-Systeme

Mit derzeit rund 3100 bekannten Vertretern, die 225 verschiedene Spezifitäten ausprägen, stellen die Typ II Restriktions-/Modifikationssysteme die größte Gruppe der R/M-Systeme dar (Roberts & Macelis, 2000; Roberts & Macelis, 2001). Bei den Typ II Systemen sind Restriktionsenzym und Methyltransferase zwei funktionell eigenständige Proteine, die im Gegensatz zu den Enzymen der Typ I und Typ III R/M-Systeme keine höhermolekularen

Proteinkomplexe miteinander bilden. Die DNA-Erkennungssequenzen sind in der Regel nur 4 bis 8 Basenpaare lang und palindrom.

Die Methyltransferasen sind monomere Enzyme, die S-Adenosylmethionin als Kofaktor für die DNA-Methylierung benötigen. Bei den Typ II Methyltransferasen kommen verschiedene Methylierungstypen vor, entweder können Adeninreste (m⁶A-Methyltransferasen) oder Cytosinreste (m⁵C- bzw. m⁴C-Methyltransferasen) methyliert werden. Die Vertreter eines Methylierungstyps zeigen oftmals ausgeprägte Homologien in ihrer Aminosäuresequenz (Wilson, 1992; Anderson, 1993).

Die Restriktionsenzyme (Pingoud & Jeltsch, 1997) sind meist Homodimere und spalten die DNA an beiden Strängen an definierten Positionen innerhalb der Erkennungssequenz oder unmittelbar zu ihr benachbart. Dabei können 3'-überstehende, glatte oder 5'-überstehende DNA-Enden entstehen, die am 3'-Ende immer eine freie OH-Gruppe und am 5'-Ende immer einen Phosphatrest tragen. Als Kofaktor für die DNA-Spaltung wird lediglich Mg²⁺ benötigt. Typ II Restriktionsenzyme sind nicht wie die der R/M-Typengruppen I und III abhängig von ATP.

Obwohl die Aminosäuresequenzen der Typ II Restriktionsenzyme keine signifikanten Homologien aufweisen (Roberts & Halford, 1993), sind im Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen verschiedener Vertreter strukturelle Ähnlichkeiten in der generellen Architektur der Proteine (Aggarwal, 1995) und insbesondere im katalytischen Zentrum erkennbar (Newman *et al.*, 1990; Thielking *et al.*, 1991; Venclovas *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Athanasiadis *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 1995).

Der Gruppe der Typ II R/M-Systeme werden noch zwei Untergruppen zugeschrieben, deren Vertreter zwar große Ähnlichkeiten mit denen der Typ II R/M-Systeme aufweisen, aber aufgrund besonderer Eigenschaften nicht eindeutig der Typengruppe II zugeordnet werden können.

1.2.1. Typ IIe R/M-Systeme

Die Restriktionsendonukleasen der Typ IIe R/M-Systeme ("e" steht für *effector*) erkennen wie die der Typ II Systeme eine kurze, palindrome DNA-Sequenz, benötigen für eine katalytische DNA-Spaltung jedoch spezifische Kontakte zu zwei räumlich getrennten Erkennungssequenzen. Die zweite Erkennungssequenz muss dafür nicht in dem gleichen DNA-Molekül (*in cis*) vorhanden sein, sondern kann auch *in trans* in einer anderen DNA lokalisiert sein (Krüger *et al.*, 1988; Oller *et al.*, 1991). Eine lange DNA, die nur eine einzige

Erkennungssequenz für ein Typ IIe Restriktionsenzym enthält, kann von der Nuklease nicht gespalten werden. Dies läßt sich jedoch durch Zugabe kurzer DNA-Fragmente erzielen, wenn diese die Erkennungssequenz enthalten (*review*: Krüger *et al.*, 1995a). Diese *in-trans*-Aktivierung brachte der zugegebenen DNA den Namen Effektor-DNA ein. Der Kontakt zu einer zweiten Erkennungssequenz auf dem selben DNA-Molekül wird bei den ATP-unabhängigen Typ IIe Enzymen nicht wie bei den Typ I Systemen durch DNA-Translokation erlangt, sondern durch DNA-*looping* (Mücke *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2000). Entsprechend wird durch Bindung anderer Proteine an die DNA zwischen den beiden Erkennungssequenzen, zum Beispiel durch einen Lac-Repressor, die Knüpfung des Kontaktes des Typ IIe Enzyms zu der zweiten Erkennungssequenz nicht gestört (Reuter *et al.*, 1998).

Typ IIe Restriktionsendonukleasen sind wie die der Typ II Systeme Homodimere (mit der tetrameren Ausnahme *SfiI* aus *Streptomyces fimbriatus*; Wentzell *et al.*, 1995) und besitzen zum Teil konservierte Sequenzmotive von Ligasen, Topoisomerasen oder Integrasen, mit denen sie möglicherweise eine gemeinsame evolutionäre Abstammung besitzen. Diese Motive sind für die Funktion der Nuklease wichtig (Topal & Conrad, 1993; Jo & Topal, 1995).

1.2.2. Typ IIs R/M-Systeme

Typ IIs R/M-Systeme erkennen kurze, nichtpalindrome DNA-Sequenzen und schneiden beide DNA-Stränge in einem geringen Abstand außerhalb dieser Erkennungssequenz (Szybalski *et al.*, 1991). Kenntnisse über Struktur und Katalysemechanismus der Restriktionsenzyme dieser Untergruppe liegen im Detail bisher nur über die *FokI* Restriktionsendonuklease vor, die den DNA-Doppelstrang 9 bzw. 13 bp von ihrer unsymmetrischen Erkennungssequenz 5'-GGATG-3' schneidet (Sugisaki & Kanazawa, 1981). Das Enzym ist funktionell in eine N-terminale DNA-Erkennungsdomäne und eine C-terminale Katalyseudomäne getrennt (Wah *et al.*, 1997), wobei letztere eine auffallende strukturelle Ähnlichkeit mit der Untereinheit der Typ II Restriktionsendonuklease *BamHI* besitzt (Newman *et al.*, 1994). Der modulare Aufbau aus zwei Domänen unterschiedlicher Funktion wird auch für andere Typ IIs Restriktionsenzyme vermutet, z. B. für *StsI* (Kita *et al.*, 1992a, 1992b).

1.3. Typ III R/M-Systeme

Auch die Vertreter der Typ III Restriktions-/Modifikationssysteme besitzen wie die der Typ I R/M-Systeme viele Eigenschaften, in denen sie dem in dieser Arbeit untersuchten Restriktionssystem McrBC ähneln. Daher soll hier auch die Typengruppe der Typ III R/M-Systeme etwas genauer vorgestellt werden.

Wie bei den Typ I R/M-Systemen sind auch bei den Vertretern dieser Typengruppe sowohl die Methyltransferase- als auch die Restriktionsendonuklease-Aktivität in einem bifunktionellen, heteromeren Enzymkomplex vereinigt. Im Gegensatz zu Typ I Systemen, die aus drei Untereinheiten (HsdR, HsdM und HsdS) gebildet werden und als R_2M_2S -Heteropentamer vorliegen, bestehen Typ III R/M-Systeme nur aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die ein Heterodimer bilden. Die beiden Untereinheiten werden durch die Gene *mod* und *res* codiert, die in operonartiger Struktur in der Reihenfolge *mod-res* angeordnet sind, wobei das Stopcodon TAA des *mod*-Gens und das Startcodon ATG des *res*-Gens sehr dicht, nur durch 2 bis 12 bp getrennt, nebeneinander liegen (Sharrocks & Hornby, 1991) oder sogar um 1 bp überlappen (Su *et al.*, 1999). Das Genprodukt Res ist die Restriktions-Untereinheit des Systems, das Genprodukt Mod die DNA-modifizierende Untereinheit, die nicht nur als m⁶A-Methyltransferase fungiert, sondern auch die DNA-Sequenzspezifität des Typ III Systems festlegt. Als Kofaktor und Methylgruppen-Donor für die DNA-Methylierung benötigt die Untereinheit Mod S-Adenosylmethionin, dessen Konzentration die Geschwindigkeit der Methylierungsreaktion beeinflusst (Meisel, 1993). Analog zu den Typ I R/M-Systemen existiert bei den Typ III Systemen auch in Abwesenheit der Untereinheit, die die Restriktionsaktivität ausbildet (Res bei Typ III R/M-Systemen, HsdR bei Typ I R/M-Systemen), eine aktive Methyltransferase (Mod-Monomer bei Typ III R/M-Systemen, M_2S -Trimer bei Typ I R/M-Systemen), während die Restriktions-Untereinheiten nicht ohne die Methyltransferase-Untereinheiten wirksam sein können.

Ein Charakteristikum der Typ III R/M-Systeme ist die Art ihrer DNA-Erkennungssequenz und deren Wirkung auf die Aktivität des Enzymkomplexes. Die Erkennungssequenz ist 5 bis 6 bp lang, unsymmetrisch und kann von dem Typ III System nur in einem DNA-Strang methyliert werden (Wilson, 1991). Dies bedeutet, dass aus einer Replikation der bakteriellen DNA immer unmethylierte Erkennungssequenzen für das wirtseigene Typ III R/M-System hervorgehen. Eine Zerstörung der zelleigenen DNA wird jedoch dadurch verhindert, dass die endonukleolytische DNA-Spaltung durch ein Typ III Enzym nur dann erfolgt, wenn zwei unmethylierte Erkennungssequenzen in entgegengesetzter Orientierung zueinander stehen

(Bickle & Krüger, 1993), wobei eine Kopf-an-Kopf Anordnung der Erkennungssequenzen eine stärkere Restriktionsaktivität des Typ III Systems auslöst als eine ebenfalls gegeneinander ausgerichtete Schwanz-an-Schwanz Orientierung (Meisel *et al.*, 1992). Alle Erkennungssequenzen der zelleigenen Typ III Enzyme sind jedoch so angeordnet, dass die postreplikativ unmethylierten Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung zueinander vorliegen. Solche Sequenzen stellen kein Spaltssubstrat für das Typ III Enzym dar, sondern werden von dessen Methyltransferaseaktivität methyliert. Zwei Kopf-an-Kopf orientierte Erkennungssequenzen, von denen eine methyliert ist, lösen ebenfalls keine DNA-Restriktion aus (Meisel, 1993).

Bei der Unterscheidung der Orientierung von DNA-Sequenzen zueinander muss vorausgesetzt werden, dass beide Sequenzen auf einem DNA-Molekül (*in cis*) und nicht auf getrennten Molekülen (*in trans*) liegen (Krüger *et al.*, 1995a). Zwei DNA-Sequenzen können von einem Protein entweder durch DNA-*looping* oder durch DNA-Translokation als *in cis* angeordnet ermittelt werden (Wang & Giaever, 1988; Dröge, 1994), wobei für Typ III Enzyme der Mechanismus der DNA-Translokation anzunehmen ist (Meisel, 1993). Die Res-Untereinheiten der Typ III Enzyme enthalten wie die HsdR-Untereinheiten der Typ I Systeme die für Mitglieder der Helikase-Superfamilie II charakteristischen 7 konservierten Domänen (Gorbalenya *et al.*, 1989), die möglicherweise eine Rolle bei der DNA-Translokation spielen (Su *et al.*, 1999). Typ III R/M-Systeme besitzen jedoch keine Einzelstrangseparations-Aktivität wie die Helikasen (Saha & Rao, 1997). Für eine DNA-Translokation durch ein Protein wird Energie benötigt, die in der Regel aus ATP-Hydrolyse gewonnen wird (Young *et al.*, 1994). Tatsächlich sind Typ III R/M-Systeme wie auch die Typ I Systeme bezüglich der DNA-Restriktion abhängig von ATP (Haberman, 1974; Bickle, 1993), wobei der Umsatz von ATP bei den Typ III Enzymen wesentlich geringer ist als bei denen des Typs I (Reiser & Yuan, 1977). 1 pmol des Typ III Enzyms *EcoP15I* hydrolysiert 100 pmol ATP pro Minute, das entspricht lediglich einem Prozent des ATP-Umsatzes des Typ I Enzyms *EcoK* unter gleichen Bedingungen (Meisel *et al.*, 1995). Unter bestimmten Umständen, wenn der Abstand der Kopf-an-Kopf orientierten Erkennungssequenzen des Typ III Enzyms sehr gering ist, kann eine DNA-Restriktion durch Typ III Enzyme auch durch Verwendung eines nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons erreicht werden (Yuan *et al.*, 1980b), aber nicht ohne dieses (Reiser & Yuan, 1977), so dass ATP als Kofaktor für die DNA-Restriktion zu bezeichnen ist und nicht als Kosubstrat (Yuan *et al.*, 1980b), wie es bei den Typ I R/M-Systemen der Fall ist.

Obwohl die Methyltransferase des Typ III Enzyms kein ATP als Kofaktor für die Methylierungsreaktion benötigt, wird die Effizienz dieser Reaktion durch ATP bis um das

20-fache gesteigert (Reiser & Yuan, 1977; Hadi *et al.*, 1983). Dies gilt nicht für die Methylierungsreaktion der isolierten Mod-Untereinheit, sondern nur für das Mod-Res-Heterodimer (Hadi *et al.*, 1983), und beruht möglicherweise auf einer durch die DNA-Translokationsbewegung hervorgerufene Änderung des distributiven Charakters der Reaktion in einen prozessiven (Meisel *et al.*, 1995). Desweiteren können die spezifischen DNA-Sequenzen durch die ATP-unterstützte Translokationsbewegung von dem Enzymkomplex beschleunigt gebunden werden, da die DNA-bindende Mod-Untereinheit auch unspezifisch an DNA bindet (Ahmad *et al.*, 1995).

Als Auslöser der DNA-Spaltreaktion, für die neben ATP auch Mg^{2+} -Ionen als Kofaktoren benötigt werden, wird für die Typ III R/M-Systeme eine früher auch für die Typ I Enzyme postulierte Kollision zweier in Gegenrichtung translozierender Enzymkomplexe angenommen (Meisel, 1993; Murray *et al.*, 1993; Krüger *et al.*, 1995a). Während man heute weiß, dass diese Annahme für Typ I Enzyme nur in sofern zutrifft, als dass hier die DNA-Spaltreaktion allgemein durch eine Translokationsbarriere ausgelöst wird, sprechen die Befunde im Falle der Typ III Systeme weiterhin für das "Kollisionsmodell" (Meisel *et al.*, 1995). Sowohl Typ I als auch Typ III Enzyme bleiben während der DNA-Translokation an ihre Erkennungssequenz gebunden. Im Unterschied zu den Typ I Enzymen, die die DNA bis zu tausenden von Basenpaaren von der Erkennungssequenz entfernt schneiden, findet die Hydrolyse des Phosphodiesterückgrats der DNA durch Typ III Enzyme jedoch in der Nähe der Erkennungssequenz statt, meist 20 bis 27 bp davon entfernt. Diese Spaltposition ist unabhängig von der Entfernung der beiden Erkennungssequenzen, allerdings wird immer nur in der Nähe einer der beiden Erkennungssequenzen geschnitten, nicht aber bei beiden gleichzeitig. An welcher der beiden Erkennungssequenzen die DNA-Restriktion erfolgt, scheint zufallsbedingt zu sein (Meisel *et al.*, 1995). Eine DNA-Spaltung durch ein Typ III Enzym, das nach Bindung an eine singuläre DNA-Erkennungssequenz die DNA transloziert, kann auch durch ein zweites, anderes Typ III Enzym, das an eine ebenfalls singuläre, bezüglich der anderen Sequenz Kopf-an-Kopf orientierte Erkennungssequenz bindet, ausgelöst werden (Kunz *et al.*, 1998). Hinsichtlich der Auslösung der DNA-Spaltung verhalten sich die Typ III R/M-Systeme also wie Typ I Enzyme in der entsprechenden Situation. Bei letzteren fungiert das zweite Enzym jedoch lediglich als eine Translokationsbarriere, was auch ein an die DNA gebundener Lac-Repressor bewirken kann. Dies ist bei den Typ III Systemem jedoch nicht der Fall (Kunz *et al.*, 1998). Um eine DNA-Spaltung zu erreichen, müssen sich demnach zwei Typ III Enzymkomplexe ergänzen. Im Gegensatz zu Typ I Systemen dissoziiert ein Typ III Enzym nach der DNA-Spaltung von der DNA.

Die Gruppe der Typ III R/M-Systeme umfasst derzeit nur fünf gut untersuchte Vertreter: *EcoPI* des Prophagen I (Iida *et al.*, 1983) und *EcoP15* aus dem Prophagen-I-Plasmid p15B in *Escherichia coli* (Ahmad *et al.*, 1995), *HinfIII* aus *Haemophilus influenzae* (Kauc & Piekarowicz, 1978), *StyLTI* aus *Salmonella typhimurium* (Backer & Colson, 1991) und *LlaFI* aus *Lactococcus lactis* (Su *et al.*, 1999). Damit sind diese Restriktionssysteme sowohl in grampositiven als auch gramnegativen Eubakterien zu finden.

1.4. Typ IV R/M-Systeme

Der Prototyp dieses Typs von R/M-Systemen (Petrusyte *et al.*, 1988) ist *Eco57I* (Janulaitis *et al.*, 1992a). Die Restriktionsendonuklease dieses Typs ist monomer, besitzt aber auch eine Methylaseaktivität. Im Gegensatz zu der Methyltransferase, die beide DNA-Stränge der Erkennungssequenz zu methylieren vermag, modifiziert die Methylaseaktivität des Restriktionsenzym jedoch nur einen Strang. Zielbase ist in beiden Fällen das äußere Adenin der unsymmetrischen Erkennungssequenz 5'-CTGAAG-3'. Das Restriktionsenzym ist stimulierbar durch den Kofaktor SAM und strikt abhängig von Mg^{2+} , während die Methylase durch Ca^{2+} stimulierbar ist. Typ IV R/M Systeme sind nicht abhängig von ATP, stellen aber in ihrer Struktur ein Intermediat in der evolutionären Entwicklung von Typ II und Typ III R/M-Systemen dar (Janulaitis *et al.*, 1992b).

Neben den Restriktions-/Modifikationssystemen gibt es auch Methyltransferasen und Restriktionsendonukleasen, die nicht Bestandteil eines solchen Systems sind. So besitzt zum Beispiel *Escherichia coli* mit *EcoDam* eine Adenin-Methylase (Hattman *et al.*, 1978; Geier & Modrich, 1979) und mit *EcoDcm* eine Cytosin-Methylase (May & Hattman, 1975; Buryanov *et al.*, 1978), deren Aktivitäten keine Restriktionsendonukleasen von *E. coli* beeinflussen. Umgekehrt besitzt *E. coli* auch Restriktionssysteme, deren Aktivität nicht durch eine Methyltransferase eingeschränkt wird. Es handelt sich hierbei um Endonukleasen, deren DNA-Erkennungssequenz im Gegensatz zu denen der Restriktionsenzyme der oben beschriebenen Restriktions-/Modifikationssysteme methyliert sein muss, damit das Enzym endonukleolytische Aktivität zeigt (Noyer-Weidner & Trautner, 1993). Da keine Methyltransferase aus *E. coli* die Erkennungssequenzen dieser methylierungsabhängigen Restriktionsenzyme methyliert, ist die zelleigene DNA vor einem Verdau durch diese Enzyme geschützt. Eindringende Fremd-DNA wird hingegen sofort gespalten, sofern sie ein entsprechendes Methylierungsmuster trägt. Dies kann zum Beispiel bei Vertebraten-DNA der

Fall sein, aber auch bei DNA von Phagen, die durch einen anderen Bakterienstamm vermehrt und durch dessen Methyltransferasen modifiziert wurde. Somit sind diese methylierungsabhängigen Restriktionsenzyme eine wichtige Ergänzung im Schutzsystem vor Phagen, denn eine solche Phagen-DNA kann unter Umständen nicht durch die Endonukleasen der R/M-Systeme zerstört werden, da diese nur an bestimmten Positionen unmethylierte Sequenzen erkennen und somit ein entsprechendes Methylierungsmuster der DNA die Sequenzerkennung durch das Restriktionsenzym verhindern kann.

1.5. Methylierungsabhängige Restriktionsendonukleasen aus *Escherichia coli*

Zu den Restriktionsendonukleasen aus *Escherichia coli* gehören neben den Restriktionsenzymen der Restriktions-/Modifikationssysteme (z. B. *EcoK* oder *EcoB*) auch drei Endonukleasen, die nur bei Anwesenheit bestimmter Methylierungen in der DNA restriktionsaktiv sind. Eine dieser drei methylierungsabhängigen Restriktionsendonukleasen (*Mrr*) ist in ihrer DNA-Spaltaktivität auf die Anwesenheit methylierten Adenins in einer bestimmten Sequenzumgebung angewiesen, die anderen beiden (*McrA* sowie das in dieser Arbeit untersuchte Restriktionssystem *McrBC*) hängen in ihrer Restriktionsaktivität von methylierten Cytosinresten ab.

1.5.1. *Mrr*

In seiner DNA-Spaltaktivität ist das in *E. coli* chromosomal codierte Restriktionsenzym *Mrr* (*mrr* für *methylated adenine recognition and restriction*) abhängig von dem Vorhandensein einer Methylgruppe an der exozyklischen N⁶-Position von Adenin (m⁶A) in einer bestimmten DNA-Sequenzumgebung. Die genaue Spezifität ist nicht bekannt, dem Enzym werden die Erkennungssequenzen 5'-Gm⁶AC-3' und 5'-Cm⁶AG-3' zugeschrieben (Heitman & Model, 1987). Das *Mrr* Restriktionsenzym soll zusätzlich auch DNA schneiden können, die die Sequenz m⁵CG enthält (mit m⁵C = 5-Methylcytosin; Wilson, 1991; Kelleher & Raleigh, 1991). Dieser cytosinabhängige Phänotyp des *Mrr*-Systems wird auch als *McrF* bezeichnet (*mcr* für *modified cytosine restriction*; Waite-Rees *et al.*, 1991).

1.5.2. Mcr-Systeme

Im Gegensatz zu dem Methyladenin-abhängigen Restriktionsenzym Mrr sind die Mcr-Systeme aus *E. coli* in ihrer DNA-Spaltaktivität strikt abhängig von der Anwesenheit methylierter Cytosinreste in ihren DNA-Erkennungssequenzen (*mcr* für *modified cytosine restriction*; Raleigh *et al.*, 1988). Zwei verschiedene solcher Systeme sind im *E.-coli*-Chromosom codiert. Das eine System, McrA (RglA), ist genetisch in dem prophagenähnlichen Element e14 lokalisiert (genomische Adresse des Gens *mcrA* bei 26.1 min in der Genkarte von *E. coli*) und restringiert DNA mit der Sequenz 5'-Cm⁵CGG-3' (mit m⁵C = 5-Methylcytosin; Raleigh & Wilson, 1986). McrA agiert völlig unabhängig von dem zweiten chromosomal codierten Methylcytosin-abhängigen Restriktionssystem McrBC, das in der etwa 14 kb umfassenden *immigration control region* des *E.-coli*-Chromosoms (genomische Adresse um 99 min; Raleigh *et al.*, 1989) codiert ist. Das Restriktionssystem McrBC, Thema der hier vorliegenden Arbeit, soll im Folgenden detailliert beschrieben werden. Eine nicht näher beschriebene, ebenfalls methylcytosinabhängige Restriktionsaktivität, die als McrE bezeichnet wird, soll durch das ebenfalls in der *immigration control region* codierte Protein McrD (NCBI Genbank Protein ID AAC77300) gehemmt werden (Burland *et al.*, 1995).

2. Das komplexe GTP-abhängige Restriktionssystem

McrBC aus *E. coli* K-12

Das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit ist eines der am längsten bekannten Restriktionssysteme überhaupt: die sich in vielerlei Hinsicht von allen anderen bekannten Restriktionsenzymen unterscheidende, komplexe Restriktionsendonuklease McrBC. Zum besseren Verständnis soll hier das McrBC-System näher vorgestellt werden, beginnend mit einer Beschreibung der historischen Entdeckung seiner Restriktionsaktivität.

2.1. Entdeckung der McrBC-Restriktionsaktivität

Die Restriktionsaktivität von McrBC wurde bereits 1952 bekannt, als die Restriktion von T-Phagen durch *Escherichia coli* beschrieben wurde (Luria & Human, 1952): Die DNA geradzahligiger T-Phagen enthält anstelle der Cytosinreste Hydroxymethylcytosine, die durch phagencodierte Glucosyltransferasen kovalent mit Glucose- bzw. Gentiobiosemolekülen

weiter modifiziert werden können. Varianten der Phagen T2, T4 und T6, die einen Defekt in der Glukosylierung von 5-Hydroxymethylcytosin aufweisen (*gt*⁻-Varianten), enthalten in ihrer DNA ebenso wie Phagen, die aus Bakterien mit fehlender UDP-Glucose-Phosphorylase stammen, 5-Hydroxymethylcytosin anstelle von 5-Hydroxymethylglucosylcytosin (Revel, 1983) und können zwar Bakterien des Stammes *E. coli* B erfolgreich infizieren, aber nicht Bakterien des Stammes *E. coli* K-12. Der Stamm *E. coli* K-12 muss demnach Enzyme besitzen, die die fehlende Glucosylierung der Phagen-DNA erkennen und durch Zerstörung dieser DNA die Infektion der Bakterien mit solchen Phagen verhindern. Diese Enzyme wurden als Rgl-Systeme (*rgl* für *restriction of glucoseless phages*) bezeichnet. Zwei derartige Enzymaktivitäten wurden beschrieben, die durch zwei unterschiedliche Restriktionssysteme verursacht werden: RglA und RglB (Revel, 1983).

34 Jahre später wurden die beiden bereits 1952 bekannt gewordenen Restriktionsaktivitäten bei Versuchen zur heterologen Klonierung DNA-Methyltransferasen codierender Gene in *E. coli* K-12 gleich zweimal unabhängig voneinander erneut entdeckt. Die bei diesen Arbeiten auftretenden Probleme begründen sich in der Restriktion von methylierter DNA in *E. coli* K-12, als deren Ursache das RglB-System (Noyer-Weidner *et al.*, 1986) bzw. die Mcr-Systeme (McrA und McrB, *mcr* für *modified cytosine restriction*; Raleigh & Wilson, 1986; Ross & Braymer, 1987) beschrieben wurden. Bei der Kartierung der ihnen zugrunde liegenden Gene erwiesen sich die beschriebenen Phänotypen RglA und McrA als genetisch identische Systeme, ebenso stellen RglB und McrB ein und dasselbe Restriktionssystem dar (Raleigh *et al.*, 1989). Obwohl das Kürzel *Rgl* (*restriction of glucoseless phages*) zur Benennung dieses Typs von Restriktionsphänomen historisch älter ist, wurde es dennoch durch die später eingeführte Abkürzung *Mcr* ersetzt, da deren Bedeutung (*modified cytosine restriction*) die Eigenschaften der so benannten Restriktionssysteme genauer beschreibt: Tatsächlich erkennen beide Systeme nicht eine fehlende Glucosylierung an Cytosinbasen der DNA, sondern dort vorhandene Methylgruppen.

Anscheinend gibt es scheint eine ausgeprägte Koevolution zwischen *E. coli* K-12 und dem Bakteriophagen T4. So schützen T4-Phagen ihre DNA durch (Hydroxy-)Methylierungsmodifikation vor dem Restriktionsverdau durch bakterielle Restriktions-/Modifikationssysteme. Diesem Schutzmechanismus stehen in *E. coli* K-12 methylierungsabhängige Restriktionsendonukleasen entgegen, deren Aktivität wiederum durch die Glucosylierung der Phagen-DNA verhindert wird. Zusätzlich verfügt der Phage T4 mit seinem Genprodukt Arn (*arn* für *anti-restriction endonuclease*) über einen McrBC-Inhibitor, wobei jedoch das *arn*-Gen durch das McrBC-System an einer spezifischen Schnittstelle gespalten und somit

inaktiviert werden kann (Fleischman *et al.*, 1976; Revel, 1983). Obwohl das Arn-Protein mittlerweile aufgereinigt wurde und für *in-vivo*-Untersuchungen zur Verfügung steht (Kim *et al.*, 1997), ist über die Interaktion von Arn mit dem McrBC-System in der Literatur leider nichts näheres bekannt.

2.2. Genetische Grundlagen des McrBC Restriktionssystems

Das McrBC Restriktionssystem ist in *E. coli* chromosomal codiert. Die diesem System zugrunde liegenden Gene befinden sich in der etwa 14 kb umfassenden *immigration control region* des *E. coli* Chromosoms (genomische Adresse um 99 min; Raleigh *et al.*, 1989), in der für Restriktionsfunktionen codierende Gene in größerer Anzahl vorkommen. Dort ist auch das Gen der Mrr-Restriktionsendonuklease (*mrr*, bei 98.82 min) lokalisiert wie auch die drei Gene des Typ I Restriktions-/Modifikationssystems *EcoKI* (*hsdS* bei 98.67 min, *hsdM* bei 98.70 min, *hsdR* bei 98.74 min; vgl. Abbildung 1 auf S. 19). Das Restriktionsenzym des *EcoKI*-Systems spaltet im Gegensatz zu den beiden anderen in der *immigration control region* codierten, modifikationsabhängigen Restriktionssystemen (Mrr, McrBC) nur unmethylierte DNA (Kan *et al.*, 1979).

Sequenzierungen des entsprechenden Abschnitts der *immigration control region* von *E. coli* durch Ross *et al.* (1989a) und Dila *et al.* (1990) zeigten, dass das McrBC-System durch ein bicistronisches Operon codiert wird. Die dem *mcrBC*-Operon zugrundeliegende DNA-Sequenz nach Dila *et al.* (1990) ist im Anhang auf Seite 274 angegeben. Beide offenen Leseraster, *mcrB* (genomische Adresse bei 98.63 min) bzw. *mcrC* (bei 98.60 min), besitzen jeweils mehrere potenzielle Translationsstartpunkte, durch die verschieden große Genprodukte gebildet werden können. Das Gen *mcrB* besitzt gleich drei mögliche Startpunkte für die Translation des Proteins McrB. Je nachdem, an welchem Punkt die Translation beginnt, entsteht das 465 Aminosäurereste (AS) umfassende, ca. 53 kDa schwere McrB (NCBI *Genbank Protein ID* AAA24145.1; s. S. 274), eine N-terminal um 6 Aminosäuren verkürzte Form (von Ross *et al.* [1989a] durch einen DNA-Sequenzfehler als 455 AS umfassend beschrieben und als *full length* McrB_L bezeichnet) oder ein deutlich kürzeres Protein mit einer Masse von ca. 34 kDa (McrB_s, *s* für *small*; Ross *et al.*, 1987; Panne *et al.*, 1998), dem die 167 N-terminalen AS des McrB (bzw. die 161 N-terminalen AS des McrB_L des zweiten Translationsstartes) fehlen, welches aber ansonsten sequenzgleich mit diesem ist (Ross *et al.*, 1989a). Das Gen *mcrC* besitzt zwei mögliche Startcodons für die Translation. Eines dieser Startcodons ist ein GTG-Triplett, welches mit dem Stopcodon des in der

immigration control region voranstehenden *mcrB*-Gens um ein Nukleotid überlappt. Ausgehend von diesem Startcodon wird die Ribosomen-Bindungsstelle zur Translation des *mcrC*-Gens etwa 7 bp stromaufwärts in einer dort befindlichen purinreichen Region vermutet. Das Genprodukt dieses Leserahmens ist das 348 AS umfassende McrC mit einer Masse von etwa 40 kDa (Ross *et al.*, 1989b). Ein zweiter möglicher Translationsstart des *mcrC*-Gens liegt 30 Nukleotide weiter stromaufwärts im *mcrB*-Gen (Dila *et al.*, 1990), woraus ein 41.7 kDa schweres, 358 AS umfassendes Protein entstehen kann (NCBI *Genbank Protein ID* AAA24146.1; s. Anhang *ORFs des mcrBC-Operons und Primärstrukturen der Genprodukte*, S. 274).

Der für die Transkription des *mcrBC*-Operons benutzte Promotor liegt in den Regionen -35 und -10 vor dem ersten ATG-Startcodon des *mcrB*-Gens (Ross *et al.*, 1987). *In vivo* werden McrB und das kürzere McrB_s in vergleichbaren Mengen gebildet (Ross & Braymer, 1987; Ross *et al.*, 1989a; Dila *et al.*, 1990), wobei McrB_s ausschließlich über den im gleichen Leseraster liegenden, eigenen Translationsstart im *mcrB*-Gen produziert wird und nicht durch posttranslationelle Abspaltung von McrB. *Maxicell*-Analysen ergaben ein relatives Mengenverhältnis von 3 : 3 : 1 für McrB, McrB_s und McrC *in vivo* (Ross *et al.*, 1989a).

Auffällig für das *mcrBC*-Operon ist der im Vergleich zum *E. coli* Chromosom stark verminderte Gehalt an Cytosin- und Guaninresten (Dila *et al.*, 1990). Machen Cytosine und Guanine rund 50 % der Basen in der *E. coli* DNA aus, liegt der (G + C)-Gehalt im *mcrB*-Gen nur bei 40 %, im *mcrC*-Gen sogar nur bei 37.5 %. Unmittelbar vor *mcrB* und hinter *mcrC* steigt der (G + C)-Gehalt auf die für *E. coli* normalen Werte an. Hier liegen vier (G + C)-reiche Sequenzen, die von ihrer Struktur her möglicherweise faktorunabhängige Transkriptionsterminatoren darstellen (Platt, 1986). Zwei dieser Sequenzen sind einem Element sehr ähnlich, das zwischen den *EcoKI*-Genen *hsdR* und *hsdM* liegt und von dem bekannt ist, tatsächlich Element eines Transkriptionsterminators zu sein (Loenen *et al.*, 1987). Der stark vom *E. coli* Durchschnittswert abweichende (G + C)-Gehalt der *mcrBC* Gene gibt einen Hinweis darauf, dass das McrBC-System vielleicht keine vollständige evolutionäre Entwicklung von *Escherichia coli* ist. Man kann vermuten, dass das System auf genetischer Basis aus einem Fremdorganismus aufgenommen wurde (Dila *et al.*, 1990), möglicherweise als ein Vorläufer-System, das im ursprünglichen Wirtsorganismus sogar mit einer anderen Aufgabe betraut war. Dafür sprechen auch einige andere Eigenschaften des Systems, die im Folgenden vorgestellt werden.

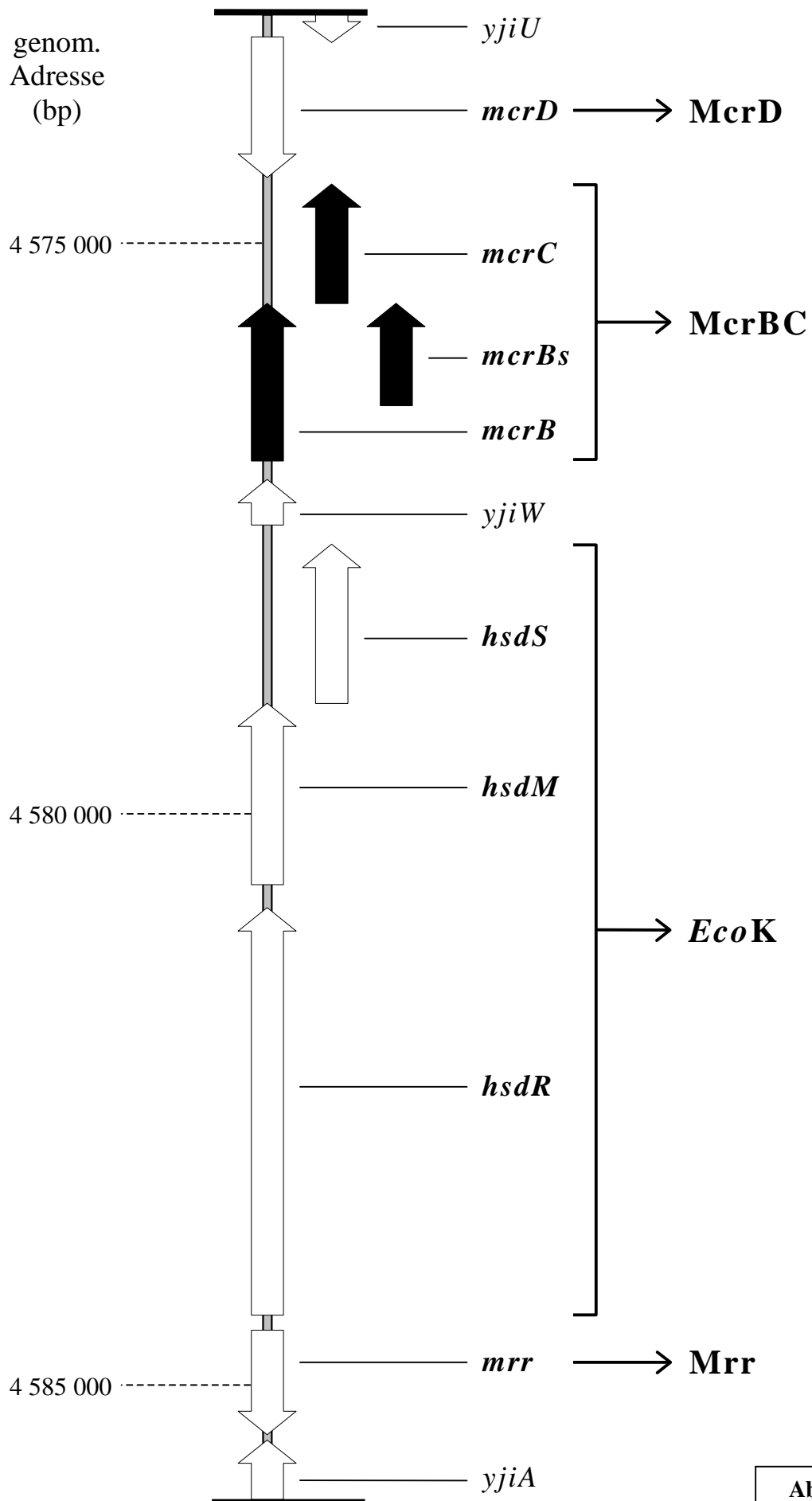


Abbildung 1

Zu Seite 19:**Abbildung 1: Schematische Darstellung der *immigration control region* aus *E. coli* K-12.**

Der Abschnitt des *E.-coli*-Chromosoms, der der genomischen Adresse von 4 573 000 bp bis 4 586 000 bp entspricht, ist als senkrecht orientierte, graue Linie dargestellt. Die Pfeile auf der Linie symbolisieren in dieser DNA-Sequenz vorhandene offene Leseraster (ORFs), die rechts parallel zur Linie verlaufenden Pfeile symbolisieren vorhandene ORFs, die zumindest teilweise mit anderen eingezeichneten Leserastern überlappen. Die Längen und Abstände der eingezeichneten offenen Leseraster sind maßstabsgetreu durch die Länge und Position der jeweiligen Pfeilsymbole wiedergegeben. Zur Orientierung ist links des gezeigten Chromosomenabschnitts eine Skala angegeben, die sich auf die genomische Adresse, angegeben in Basenpaaren, bezieht. Die Richtung der Pfeile gibt Auskunft über die Orientierung der ORFs im Bakterienchromosom (nach unten zeigende Pfeile symbolisieren eine in der *E.-coli*-Genkarte im Uhrzeigersinn orientierte Leserichtung, nach oben zeigende Pfeile die entgegengesetzte Richtung). Auf der rechten Seite, neben der Darstellung des Chromosomenabschnitts, sind die Namen der jeweiligen offenen Leseraster angegeben, rechts davon, sofern bekannt, die Namen der daraus hervorgehenden funktionellen Genprodukte. Die Angaben beziehen sich auf den *GenBank* Eintrag NC_000913 (korrigierte Version der *E.-coli*-Genomsequenz vom 13.10.1998; nach Blattner *et al.*, 1997).

2.3. Struktur der McrBC-Proteine

Das McrBC-System wurde durch seine Eigenschaft, in *Escherichia coli* als Restriktionsenzym wirksam sein zu können, bekannt. Um als solches agieren zu können, muss es an DNA binden können und dort, im Unterschied zu einer unspezifischen Nuklease, vor der DNA-Restriktion eine mehr oder minder definierte DNA-Sequenz erkennen. Um nach dem Auffinden einer charakteristischen Erkennungssequenz die Hydrolyse des Zuckerphosphatrückgrats der DNA katalysieren zu können, muss das System mindestens ein katalytisch aktives Zentrum besitzen. bis heute ist nicht bekannt, wo sich im McrBC-System jene Bereiche befinden, die für die DNA-Hydrolyse verantwortlich sind. *In vivo* wird nach dem derzeitigen Stand der Dinge das McrBC-System aus drei Proteinen gebildet: McrB, McrB_s und McrC (Dila *et al.*, 1990; Krüger *et al.*, 1992; Raleigh, 1992). Weder McrB_s noch McrC sind allein in der Lage, DNA-Restriktion hervorzurufen, auch die Kombination von McrB_s und McrC ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* katalytisch inaktiv im Hinblick auf DNA-Hydrolyse (Beary *et al.*, 1997). Während Restriktion bestimmter DNA *in vivo* durch alleinige Anwesenheit von McrB beobachtet wurde (Ross *et al.*, 1989b; Dila *et al.*, 1990; auf diese Beobachtungen wird später noch näher eingegangen), kann DNA-Restriktion *in vitro* nur in Anwesenheit von McrB und McrC erzielt werden (Sutherland *et al.*, 1992). McrB_s ist für die DNA-Restriktion nicht erforderlich (Sutherland *et al.*, 1992; Beary *et al.*, 1997; Panne *et al.*, 1998). Ob sich nun das katalytische Zentrum für die Spaltung des Zuckerphosphatrückgrats der DNA in McrB befindet, wie zunächst von Dila *et al.* (1990)

zugeordnet, oder in McrC, wie es heute vermutet wird (Krüger *et al.*, 1995b; Beary *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1999b), ist bisher nicht geklärt. Im Folgenden werden die Strukturen der Proteine McrB, McrB_s und McrC und die sich daraus vermuteten bzw. verifiziert zugeordneten Sequenzmotive näher vorgestellt. Leider gibt es bis heute keine Röntgenstrukturanalysen dieser Proteine.

2.3.1. McrB

Das Protein McrB besteht aus einer Kette von 465 Aminosäurereste (NCBI *Genbank Protein ID* AAA24145.1; s. S. 274). Funktionell kann es in zwei Domänen gegliedert werden: eine N-terminale Domäne, die DNA-bindende Eigenschaften besitzt, und eine C-terminale Domäne, die in ihrer Sequenz Motive enthält, die für guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) typisch sind (Dever *et al.*, 1987; Dila *et al.*, 1990).

Tatsächlich besitzt McrB GTP-bindende und -hydrolysierende Eigenschaften. Die GTPase-Funktion ist sogar obligat für die DNA-Restriktion durch das McrBC-System (Sutherland *et al.*, 1992), welches bis heute das einzige bekannte GTP-abhängige Restriktionssystem darstellt (Raleigh, 1992; Bickle, 1993). Neben GTP können mit geringerer Effizienz auch ITP oder XTP als Nukleosidtriphosphat-Kofaktor für die hydrolytische Spaltung der DNA durch McrBC dienen (Pieper *et al.*, 1999a). Im Gegensatz zu Typ I oder Typ III Restriktion-/Modifikationssystemen kann das McrBC-System jedoch kein ATP als Kofaktor für diese Reaktion verwenden (Sutherland *et al.*, 1992).

Bei GTP-bindenden Proteinen, wie z. B. bei Ras-p21, ARF-1, G_{iα1} oder EF-Tu, sind meist drei Aminosäuresequenzmotive besonders konserviert (Dever *et al.*, 1987; Bourne *et al.*, 1991; Kjeldgaard *et al.*, 1996), die in einer Kernstruktur aus fünf α -Helices, einem β -Faltblatt aus fünf parallelen Strängen und einem antiparallelen Strang liegen (Kjeldgaard *et al.*, 1996). Das Motiv I findet sich in einer Reihe von Proteinen, die Purinnukleosidtriphosphate binden, wie z. B. Myosin oder ATP-Synthasen. Die durch die dem Motiv I zugrunde liegende Aminosäuresequenz GxxxxGK[S/T] gebildete Struktur wird auch als phosphatbindende Schleife (*phosphate binding loop*, *P-loop*) bezeichnet. Das Motiv II (Sequenz DxxG, *switch II Region*) ist vermutlich an dem Konformationswechsel der GTP-bindenden Proteine beteiligt, wenn diese aus ihrem inaktiven Zustand, in dem sie GDP gebunden haben, in ihre aktive Form übergehen, in der sie GTP gebunden haben (Brunger *et al.*, 1990). Die aktive Form des Proteins übt in der Regel eine Effektorfunktion aus, z. B. die Aktivierung eines weiteren Proteins innerhalb einer Signaltransduktionskette. Kristallstrukturanalysen, z. B. von Ras-p21

und EF-Tu, zeigten die Beteiligung des Aspartatrests von Motiv II an der Koordination von Magnesiumionen. Beide für GTP-bindende Proteine typischen Motive sind in McrB vorhanden (Dila *et al.*, 1990), Motiv I in der Form GPPGVGKT (AS 207 - 214) und Motiv II als DKRG (AS 306 - 309).

Das dritte Motiv guaninnukleotidbindender Proteine besteht aus der Sequenz NKxD und definiert die Guaninspezifität der Bindung (*guanine recognition site*). Dieses Motiv ist in McrB nicht in kanonischer Form vorhanden, allerdings existieren in diesem Protein gleich zwei potenzielle Sequenzen, die als Motiv III agieren könnten: NTAD (AS 339 - 342) und NKKA (AS 376 - 379). Die erste Sequenz (NTAD), die 1990 von Dila *et al.* und 1992 von Sutherland *et al.* als funktionelles Motiv III vorgeschlagen wurde, hat zwar mit 29 AS einen im Vergleich zu anderen GTP-bindenden Proteinen (Ras-p21 und ARF-1 je 55 AS, G_{iα1} 65 AS; Kjeldgaard *et al.*, 1996) recht geringen Abstand zum Motiv II (der Abstand der zweiten möglichen Motiv-III-Sequenz in McrB [NKKA] zu Motiv II beträgt 66 AS), dennoch konnten Pieper *et al.* (1997) durch Mutageneseexperimente zeigen, dass NTAD (AS 339 - 342) in McrB als Motiv III guaninnukleotidbindender Proteine fungiert und nicht NKKA (AS 376 - 379). Dieser Befund wird durch Kristallstrukturanalysen verschiedener GTP-bindender Proteine gestützt, die die maßgebliche Beteiligung des Aspartatrests der NKxD-Konsensussequenz an der Erkennung der Guaninbase zeigen.

Für verschiedene GTP-bindende Proteine konnte durch einen bestimmten Aminosäureaustausch die Spezifität des jeweiligen Systems für das Nukleosid-5'-Triphosphat geändert werden: Ein Austausch des Aspartatrests der Konsensussequenz NKxD (Motiv III der G-Proteine) gegen Asparagin ergab bei EF-Tu (D138N, Hwang & Miller, 1987; Weijland *et al.*, 1994), Ras-p21 (D119N, Schmidt *et al.*, 1996) und rab5 (D126N, Hoffenberg *et al.*, 1995) eine Änderung der NTP-Spezifität von GTP zu XTP. Ein entsprechender Austausch in McrB (D342N) erzielt jedoch keine XTP-Spezifität für McrB (Pieper *et al.*, 1999a: D336N, Aminosäurereste vom zweiten Startcodon aus nummeriert).

Die GTPase von McrB hydrolysiert GTP in einer Reaktion vom *multiple-turnover*-Typ (Pieper *et al.*, 1997). Dabei zeigt die GTPase eine Abhängigkeit von der GTP-Konzentration, die eine Michaelis-Menten-Kurve beschreibt ($k_{\text{cat}} \simeq 0.4 \text{ min}^{-1}$, $K_{\text{M}} \simeq 1 \mu\text{M}$ [bei 25 °C]). Die Hydrolyse von GTP durch McrB ist absolut abhängig von der Anwesenheit von Magnesiumionen, deren optimale Konzentration bei 2 bis 15 mM liegt.

Die meisten Mitglieder der G-Protein Superfamilie zeigen eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte stärkere Affinität zu GDP als zu GTP und benötigen ein GEF-Protein (*GEF* für *guanine-nucleotide exchange factor*) zur Herabsetzung ihrer Bindungsaffinität zu GDP, um

nach erfolgter Hydrolyse von GTP zu GDP wieder GTP binden zu können. McrB bindet GDP jedoch 50-mal schwächer als GTP (die Affinität für GTP [K_{ass}] beträgt ca. 10^6 M^{-1} , die für GDP $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$; Pieper *et al.*, 1997, 1999a) und benötigt daher auch kein GEF-Protein. Die Dissoziationskonstante des McrB · GTP Komplexes (K_{diss}) beträgt ca. $0.6 \mu\text{M}$.

McrB besitzt eine intrinsische GTPase, d. h. der GTP-Umsatz zu GDP und freiem Phosphat durch das Enzym erfolgt auch ohne Stimulation von außen. Die Umsatzgeschwindigkeit beträgt dabei $0.5 - 0.7 \text{ GTP min}^{-1}$ pro McrB bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Pieper *et al.*, 1997, 1999a). Bindung von McrB an die Untereinheit McrC des McrBC-Systems erhöht diese Umsatzgeschwindigkeit um etwa das 30-fache, während Bindung an spezifische DNA einen schwächeren Effekt auf die Hydrolyserate von GTP durch McrB in An- oder Abwesenheit von McrC hat (Panne *et al.*, 1999). Interessanterweise setzt McrB unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady state*), die DNA-Spaltung ermöglichen, mehr GTP um als DNA (Pieper *et al.*, 1997). Der Zusammenhang von GTP-Hydrolyse und DNA-Spaltung durch McrBC ist bisher nicht bekannt. GTP könnte, analog zur Rolle von ATP bei Typ I Restriktions-/Modifikationssystemen, als Energiequelle für eine (Translokations-) Bewegung des Enzymkomplexes auf der DNA dienen (Studier & Bandyopadhyay, 1988) oder eine Funktion in der Regulation des Wechsels zwischen einer aktiven und einer inaktiven Konformation des Proteins besitzen, wie es auch bei EF-Tu, Ras und den G-Proteinen der Signaltransduktionsketten der Fall ist (Bourne *et al.*, 1990; 1991).

Die Bindung von GTP an McrB hat auch entscheidenden Einfluss auf die thermische Stabilität des Enzyms (Pieper *et al.*, 1997), ein Effekt, den man auch von anderen G-Proteinen kennt, z. B. von EF-Tu aus *E. coli* (*u* steht für *unstable*; Lucas-Lenard & Lipman, 1966; Miller & Weissbach, 1974; Wittinghofer & Leberman, 1976; Pingoud *et al.*, 1977), und der unabhängig von der Konzentration an Magnesiumionen ist (Pieper *et al.*, 1997). Außer durch die Bindung von GTP wird McrB auch durch die Bindung von GDP stabilisiert, allerdings erst ab wesentlich höheren Konzentrationen an Nukleosid-Diphosphat, da GDP von McrB deutlich schwächer als GTP gebunden wird (Pieper *et al.*, 1997).

ATP kann nicht als Kofaktor für die DNA-Hydrolyse dienen und wird auch nur schwach von McrB gebunden (Pieper *et al.*, 1997). Ein früher berichteter inhibitorischer Effekt von ATP auf die DNA-Hydrolyse des McrBC-Systems (Sutherland *et al.*, 1992) konnte nicht von allen Arbeitsgruppen beobachtet werden (Krüger *et al.*, 1995b). Bezüglich der GTP-Bindung durch McrB tritt ein inhibitorischer Effekt durch ATP erst bei einem ATP zu GTP Verhältnis von 500 : 1 auf (Pieper *et al.*, 1997).

McrB besitzt mit dem Aminosäureabschnitt 384 bis 406 (vgl. Anhang, S. 274) eine Sequenz, die nach Strukturvorhersagen (Programm COILS 2.1; Lupas *et al.*, 1991) eine *coiled coil* Struktur auszubilden vermag. Damit wäre in dem Protein eine Domäne zur Oligomerisierung von McrB oder möglicherweise ein Ort der Interaktion mit McrC lokalisiert (Gast *et al.*, 1997).

Neben der im C-terminalen Abschnitt seiner Aminosäurekette lokalisierten Eigenschaft, GTP binden und hydrolysieren zu können, und der dort lokalisierten potenziellen *coiled coil* Domäne, besitzt McrB noch das Vermögen der DNA-Bindung (Krüger *et al.*, 1995b). Die DNA-Bindung erfolgt durch die 162 N-terminalen AS des Proteins. Diese N-Domäne vermag auch isoliert mit der gleichen Affinität wie McrB an DNA zu binden, interagiert aber nicht mit GTP (Gast *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1999b). Damit ist McrB die einzige Untereinheit des McrBC-Systems, für die eine spezifische DNA-Bindung ($K_{\text{ass}} \simeq 10^7 \text{ M}^{-1}$) gezeigt werden konnte (Gast *et al.*, 1997).

2.3.2. McrB_s

Das Protein McrB_s ist eine verkürzte Variante von McrB, ihm fehlen die 167 N-terminalen Aminosäurereste des vollständigen Proteins. McrB_s ist allerdings kein Proteolyseprodukt aus McrB (Ross *et al.*, 1989a; Krüger *et al.*, 1992), sondern wird durch Translation des *mcrB*-Gens unter Verwendung eines internen ATG-Startcodons gebildet. Dieses Startcodon liegt im gleichen Leseraster (*in frame*) des *mcrB*-Gens, aus dem auch das McrB-Protein gebildet wird (Ross *et al.*, 1989a; Dila *et al.*, 1990). Somit ist McrB_s sequenzgleich mit den 298 Aminosäureresten des C-terminalen Teils von McrB.

Die Funktion von McrB_s ist nicht bekannt. Obwohl das Protein GTP mit der gleichen Affinität wie McrB zu binden vermag und auch dessen intrinsische GTPase besitzt (Pieper *et al.*, 1999b), und obwohl McrB_s auch mit McrC zu interagieren vermag (Panne *et al.*, 1998), ist es weder für eine DNA-Spaltung durch das Restriktionssystem McrBC *in vitro* notwendig (Sutherland *et al.*, 1992), noch kann es McrB für Restriktion von DNA *in vivo* (Beary *et al.*, 1997) oder DNA-Spaltung *in vitro* ersetzen (Panne *et al.*, 1998). Da McrB_s *in vivo* im selben Masse wie McrB gebildet wird (Ross & Braymer, 1987; Ross *et al.*, 1989a; Dila *et al.*, 1990) und eine erhöhte oder verminderte Expressionsrate zu einer weniger effizienten DNA-Restriktion durch McrBC führt (Beary *et al.*, 1997), wird McrB_s eine Modulation spaltaktiver McrBC-Komplexe sowohl *in vivo* (Beary *et al.*, 1997) als auch *in vitro* (Panne *et al.*, 1998) zugeschrieben.

2.3.3. McrC

Das Protein McrC besteht aus einer Kette von 358 Aminosäureresten (NCBI *Genbank Protein ID* AAA24146.1; s. Anhang *ORFs des mcrBC-Operons und Primärstrukturen der Genprodukte*, S. 274). Die genaue Funktion von McrC ist bis heute unklar. Durch die leicht basische Struktur des Proteins (es besitzt 18 basische Aminosäurereste mehr als saure [Ross *et al.*, 1989a]) wurde früher vermutet, dass es DNA-Bindungseigenschaften besitzt (Dila *et al.*, 1990). Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, dass McrC weder an unmethylierte noch an für das McrBC-System spezifisch methylierte DNA zu binden vermag (Krüger *et al.*, 1995b). Auch eine andere, dem McrC-Protein zunächst zugeordnete Funktion erwies sich als Irrtum: Nachdem zunächst das Gerücht in die Welt gesetzt wurde, die *in-vitro*-Restriktion von 5-methylcytosinhaltiger DNA durch das McrBC-System sei abhängig von ATP (E. Sutherland & E. A. Raleigh, *Abstract Workshop on Biological DNA Methylation*, S. 35, 1988), fanden Ross *et al.* (1989a) nach gezielter Suche in McrC beide von Walker *et al.* (1982) veröffentlichten Konsensussequenzen der ATP-Bindungsdomänen von ATP-bindenden Proteinen in leicht abgewandelter Form. Das McrBC-System ist jedoch nicht abhängig von ATP, auch besitzt McrC keine hohe Affinität zu ATP.

In McrC ist das *leucine-heptad-repeat*-Motiv ("Leucin Zipper") der Form $Lx_6Lx_6Lx_6L$ zu finden. Derart an einer α -Helix periodisch wiederholte Leucinreste ermöglichen Proteinen die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren und spielen eine Rolle bei der Proteindimerisierung oder bei der Protein-Protein-Erkennung (Landschulz *et al.*, 1988). Eine solche Funktion des Leucin-Zippers kann auch für McrC vermutet werden. Unklar ist, ob es sich bei der vermuteten Interaktion um eine McrC-Dimerisierung oder um eine Verbindung zu McrB oder zu einem weiteren Protein handelt, dass *in vivo* eine bis jetzt nicht bekannte Funktion ausübt oder phylogenetisch betrachtet einst ausgeübt hat.

McrC wirkt deutlich stimulierend auf die GTP-Hydrolyseaktivität von McrB (Pieper *et al.*, 1997). Mit seiner Stimulation auf das 30-fache der GTPase-Grundaktivität besitzt es jedoch eine im Vergleich mit anderen GTPase aktivierenden Proteinen geringe Wirkung, so wirkt z. B. ras-GAP (*GAP = GTPase activating protein*) 10^5 -fach stimulierend auf Ras (Gideon *et al.*, 1992). Zur typischen Aufgabe eines GAP gehört es, durch Beschleunigung der GTP-Hydrolyse das Zielprotein in einen inaktiven Zustand zu versetzen (Kjeldgaard *et al.*, 1996). Entsprechend halten nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga die G-Proteine in der aktiven Zustandsform, während nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga den McrBC-Enzymkomplex bezüglich der DNA-Spaltung inaktivieren. Somit ist McrB nicht Zielprotein von McrC im

Sinne der klassischen GAP-Funktion, dennoch wird eine Signalfunktion des GTP vermutet (Sutherland *et al.*, 1992). Bei GTP-bindenden Proteinen vermitteln meist GEF-Proteine (*GEF* für *guanine-nucleotide exchange factor*) den Austausch von GDP in der inaktiven Zustandsform des guaninnukleotidbindenden Proteins gegen GTP, da die Bindungsaffinität der GTPase für GDP gegenüber der für GTP oft sehr hoch ist (z. B. Ras-p21, $K_{\text{ass}}[\text{GDP}] \simeq 5.7 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{ass}}[\text{GTP}] \simeq 6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$; Feuerstein *et al.*, 1987). Wie oben erwähnt, bindet McrB jedoch GDP deutlich schwächer als GTP, ein GEF wird im McrBC-System daher nicht benötigt.

Da früher zunächst beschrieben wurde, dass zur *in-vivo*-Restriktion von DNA bereits die Anwesenheit von McrB ausreichend ist (Ross *et al.*, 1989b; Dila *et al.*, 1990), wurde McrC eine Funktion zugeschrieben, die das Spektrum möglicher DNA-Substrate von McrB durch Komplexierung von McrB mit McrC erweitern würde (Ross *et al.*, 1989a). Die von Ross *et al.* (1989b) beschriebene Beobachtung, McrB könne *in vivo* in Abwesenheit von McrC 5-hydroxymethylcytosinhaltige Phagen-DNA restringieren, erwies sich bei genauerer Betrachtung als Irrtum, da der verwendete Bakterienstamm eine residuelle McrC-Expression zeigte (Krüger *et al.*, 1992). Später wurde das katalytische Zentrum, das die Hydrolyse des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA durchführen soll, in der Untereinheit McrC vermutet (Beary *et al.*, 1997). Tatsächlich läßt sich in McrC ein abgeschwächtes Sequenzmotiv finden, das typisch für das katalytische Zentrum von Typ II Restriktions-/Modifikationssystemen ist. Das $\text{PD}_{\text{X}_{10-30}}(\text{D/E})\text{XK}$ -Motiv (Venclovas *et al.*, 1994; Aggarwal, 1995; Pingoud & Jeltsch, 1997) findet sich in ähnlicher Form auch bei DNA-schneidenden Enzymen, z. B. bei Typ I und Typ III Restriktions-/Modifikationssystemen (Davies *et al.*, 1999) sowie Reparaturenzymen wie den RecB-Endonukleasen (Yu *et al.*, 1998; Aravind *et al.*, 1999), und liegt in McrC in der Form $\text{TD}_{\text{X}_{12}}\text{DAK}$ (AS 253 - 269) vor. Ob McrC tatsächlich die Untereinheit des McrBC-Systems ist, die an der DNA die Phosphodiester-Hydrolysereaktion katalysiert, ist bis heute nicht bekannt. Fakt ist, dass *in vitro* die Anwesenheit von McrC neben McrB zum Erzielen der Restriktionsaktivität des Systems zwingend notwendig ist (Sutherland *et al.*, 1992). Des Weiteren zeigen neuere Mutageneseexperimente, in denen durch singuläre Aminosäureaustausche Alaninreste die Aspartatreste des vermuteten katalytischen Motivs von McrC ersetzen, dass diese Aminosäurepositionen hinsichtlich der DNA-Analyse essentiell sind: Die D→A McrC-Varianten vermögen zwar noch die GTPase von McrB im vollem Umfang zu aktivieren, was für eine intakte Protein-Protein-Interaktion spricht, können mit McrB aber keinen DNA-spaltaktiven Enzymkomplex bilden (U. Pieper, Publikation in Vorbereitung).

2.4. DNA-Bindung und -Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem

Als GTP-abhängiges Restriktionssystem besitzt die McrBC-Restriktionsendonuklease neben der oben beschriebenen GTPase-Aktivität auch die Eigenschaft, doppelsträngige DNA endonukleolytisch spalten zu können. Diesem Ereignis geht eine Bindung des aus mehreren Untereinheiten (McrB und McrC, *in vivo* auch McrB_s, s.o.) bestehenden McrBC-Komplexes an die DNA sowie das Erkennen von McrBC-spezifischen DNA-Sequenzen voraus. Im Unterschied zu den meisten der über 3000 bekannten Restriktionsenzymen erkennt und spaltet McrBC nicht unmethylierte, sondern methylierte DNA.

2.4.1. Erkennung von Cytosin-Modifikationen in der DNA

Das McrBC-System wurde durch seine Eigenschaft, *in vivo* bestimmte methylierte DNA restringieren zu können, entdeckt (s. o.). Tatsächlich ist das System in der Lage, Cytosinmodifikationen (5-Methylcytosin, 5-Hydroxymethylcytosin und N⁴-Methylcytosin), nicht jedoch Adeninmodifikationen (N⁶-Methyladenin), in der DNA zu erkennen und diese auch zu spalten (*mcr* steht für *modified cytosine restriction*), sofern die Cytosinmodifikationen in einem bestimmten Sequenzkontext stehen (Revel, 1967; Noyer-Weidner *et al.*, 1986; Raleigh & Wilson, 1986; Raleigh *et al.*, 1988, 1989). Erkannt werden die Cytosinmodifikationen durch das McrBC-System jedoch nur, wenn sie 3' zu einem Purinrest im DNA-Doppelstrang liegen (Raleigh & Wilson, 1986; Sutherland *et al.*, 1992). Die DNA-Erkennungssequenz vom McrBC-Restriktionssystem ist demnach R^mC (mit R = Purinrest, ^mC = methylierter Cytosinrest).

2.4.2. Erkennungssequenzen und Erkennungselemente von McrBC

Interessanterweise benötigt das McrBC-System zur Spaltung linearer DNA zwei Sequenzelemente der Form 5'-R^mC-3' in einem DNA-Molekül, die als zusätzliche Anforderung einen bestimmten Abstand voneinander haben müssen (Sutherland *et al.*, 1992).

Die Erkennungssequenz dieses Restriktionssystems ist mit zwei Nukleotiden (R^mC) sehr kurz und einfach organisiert. Zusätzlich ist das 5'-ständige Nukleotid nicht eindeutig definiert, sondern darf eine von zwei verschiedenen Basen (die Purine Adenin oder Guanin) enthalten. Hinzu kommt, dass die DNA nur in einem der beiden Stränge die Erkennungssequenz tragen muss (z. B. in hemimethylierter DNA), um vom McrBC-System erkannt zu werden.

Methylierungen in beiden Strängen an den gegenüberliegenden Positionen (z. B. in vollmethylierter DNA) sind nicht notwendig, führen aber oft zu einer verbesserten DNA-Spaltreaktion des Enzymkomplexes (Sutherland *et al.*, 1992).

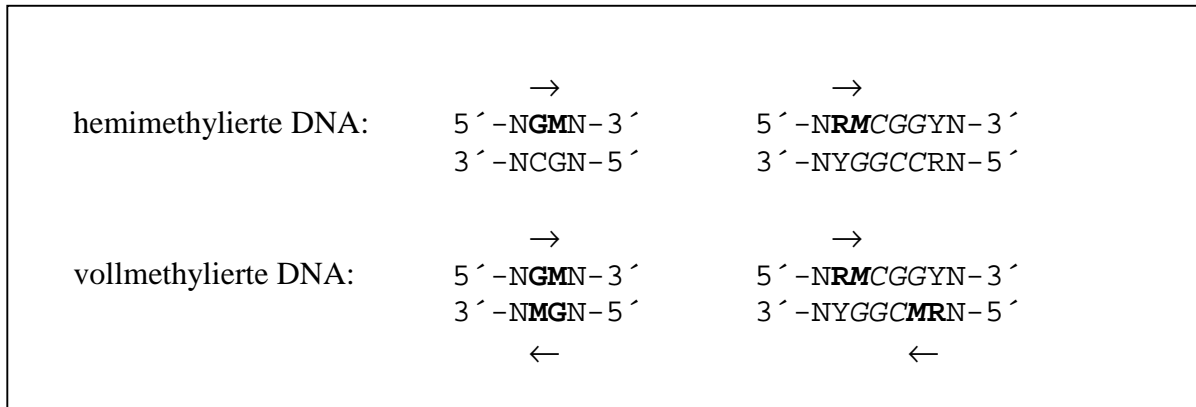


Abbildung 2: Beispiele für hemi- und vollmethylierte DNA-Sequenzen.

Die Abbildung zeigt Beispiele für hemi- und vollmethylierte DNA-Sequenzen, die McrBC-Erkennungselemente (5'-RM-3' bzw. 5'-GM-3', fett hervorgehoben und in ihrer Orientierung durch einen Pfeil markiert) enthalten. Im Beispiel rechts ist die Erkennungssequenz der *MspI*-Methyltransferase (CCGG) kursiv hervorgehoben, in der das 5'-Cytosin durch die Methylase zu 5-Methylcytosin modifiziert wird (*M*CGG); M = Methylcytosin oder Hydroxymethylcytosin.

Zwei Erkennungssequenzen, die sich in einem vollmethylierten DNA-Doppelstrang direkt (linkes Beispiel in Abbildung 2) oder in kurzem Abstand gegeneinander versetzt (rechtes Beispiel in Abbildung 2) gegenüberstehen, bilden möglicherweise für das McrBC-System eine Erkennungseinheit (siehe Kapitel *Diskussion*) und werden in dieser Arbeit zur eindeutigen Benennung im Unterschied zu der Erkennungssequenz (5'-R^mC) als ein Erkennungselement bezeichnet. Sind zwei Erkennungssequenzen weit genug voneinander entfernt, werden sie von dem McrBC-System als zwei getrennte Erkennungselemente unterschieden. Eine solche Situation liegt vor, wenn die beiden Erkennungselemente mindestens 22 bp, besser weiter als 40 bp voneinander entfernt liegen (Sutherland *et al.*, 1992; Gast *et al.*, 1997; Stewart & Raleigh, 1998).

DNA, die *in vivo* durch C-Methyltransferasen vollständig methyliert wurde, enthält McrBC-Erkennungssequenzen, wenn 5' vor der Position der modifizierten Cytosinreste eine Purinbase vorhanden ist. Dies ist zum einen der Fall, wenn die Methylase eine DNA-Erkennungssequenz besitzt, in der der zu methylierende Cytosinrest 3' zu einem nicht definierten (R) oder definierten Purinrest (A oder G) steht, wie es z. B. bei *M.AluI* der Fall ist. Diese Methyltransferase aus *Arthrobacter luteus* modifiziert das Cytosin ihrer Erkennungs-

sequenz 5'-AGCT-3' zu 5-Methylcytosin (Yoon *et al.*, 1985) und erzeugt somit immer McrBC-Erkennungssequenzen in der Form 5'-G^mC-3'. Zum anderen können auch C-Methyltransferasen, deren zu modifizierende Cytosin-Zielbase 5'-randständig in ihrer Erkennungssequenz liegt, eine McrBC-Erkennungssequenz erzeugen, wenn 5' ihrer Erkennungssequenz in der DNA ein Purinrest voransteht. Ein Beispiel hierfür ist die *MspI*-Methylase aus *Moraxella spec.*, die den ersten Cytosinrest ihrer Erkennungssequenz 5'-CCGG-3' zu 5-Methylcytosin modifiziert (Jentsch *et al.*, 1981). Abhängig vom Sequenzkontext ergeben sich aus der vollständigen Methylierung der DNA durch *M.MspI* keine, eine oder zwei Erkennungssequenzen für das McrBC-System (vgl. Abbildung 3). Letztere stehen sich im DNA-Doppelstrang fast gegenüber, so dass sie als ein McrBC-Erkennungselement zu betrachten sind.

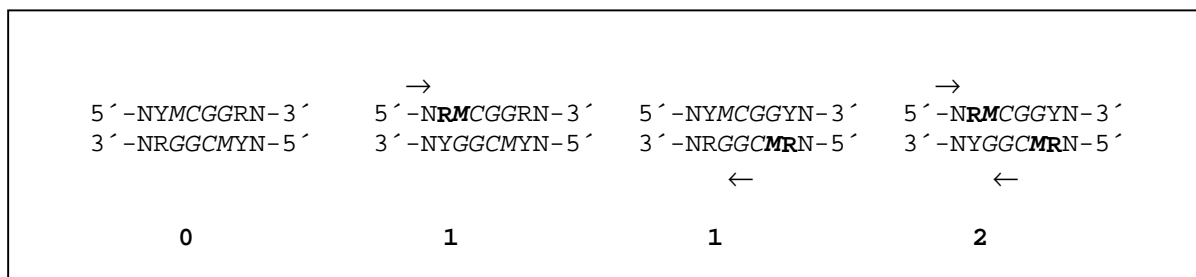


Abbildung 3: Entstehung von McrBC-Erkennungssequenzen durch DNA-Methylierung.

In der Abbildung gezeigt wird die aus vollständiger DNA-Methylierung durch die *MspI*-Methyltransferase resultierende unterschiedliche Anzahl (untere Zahlen) und Orientierung (Pfeile) an McrBC-Erkennungssequenzen (5'-RM, fett hervorgehoben) in Abhängigkeit von der direkten Sequenzumgebung der *MspI*-Erkennungssequenz CCGG (kursiv hervorgehoben: methylierte *MspI*-Erkennungssequenz *MCGG*). M = Methylcytosin oder Hydroxymethylcytosin

Wie aus dem in Abbildung 3 gezeigten Beispiel der DNA-Methylierung durch die *MspI*-Methyltransferase hervorgeht, besitzt DNA, deren Cytosinreste durch die Methylase vollständig modifiziert wurden, nicht zwingend mehr Erkennungssequenzen für das McrBC-Restriktionssystem als hemimethylierte DNA, da in diesem Falle die unmittelbare 5'-Umgebung der Methylasen-Erkennungssequenz wesentlich ist. So erzeugt die Sequenz 5'-YCCGGR-3' auch bei vollständiger *M.MspI*-Methylierung niemals eine Erkennungssequenz für das McrBC-Restriktionssystem, während die Sequenz 5'-RCCGGY-3' schon in *M.MspI*-hemimethylierter Form eine R^mC-Anordnung besitzt, die von McrBC erkannt wird. Dieser Sachverhalt ist wesentlich bei der Untersuchung der DNA-Spalteigenschaften des

McrBC-Restriktionssystem mit verschiedenen DNA-Substraten, die durch DNA-Methyltransferasen modifiziert wurden.

2.4.3. DNA-Bindung und -Spaltung

Für eine Spaltung linearer DNA benötigt das McrBC-System mindestens zwei Erkennungssequenzen (R^mC) in der DNA, die mindestens 40 bp voneinander entfernt sein müssen. Als Voraussetzung für eine mögliche DNA-Spaltung wurde ein maximaler Abstand der Erkennungssequenzen von 89 bp ermittelt (Krüger *et al.*, 1992) und als benötigtes Motiv für ein DNA-Spaltereignis durch McrBC die Konsensussequenz $5'-R^mCN_{40-80}R^mC-3'$ angegeben (Sutherland *et al.*, 1992). Interessanterweise müssen weder beide DNA-Stränge durch eine Methyltransferase vollmethyliert vorliegen, noch müssen die Erkennungssequenzen auf dem selben DNA-Strang (*in cis*) lokalisiert sein, sondern sie können auch auf beide DNA-Stränge verteilt (*in trans*) vorliegen. Liegen zwei R^mC -Elemente in einem DNA-Molekül in *in-cis*-Orientierung, sind sie parallel ausgerichtet, während sie in der *in-trans*-Orientierung antiparallel angeordnet sind. Dieser Unterschied wirkt sich weit weniger auf die Effizienz der DNA-Spaltung durch McrBC aus, als die unmittelbare Sequenzumgebung der R^mC -Elemente (Sutherland *et al.*, 1992). Bei der Entwicklung einer Modellvorstellung über den DNA-Bindungs- und Spaltungsmechanismus ist dieser Befund ein kritischer Punkt.

Die DNA-Spaltung durch die McrBC-Restriktionsendonuklease ist ein GTP-abhängiger Prozess, der zu einem DNA-Doppelstrangbruch führt. Die Position der DNA-Spaltung ist nicht genau definiert, sie kann an mehreren Positionen zwischen beiden Erkennungssequenzen in der Nähe der einen oder anderen R^mC -Sequenz erfolgen, wobei zwischen zwei Erkennungssequenzen jeweils nur ein DNA-Doppelstrangbruch erzeugt wird (Sutherland *et al.*, 1992).

Die Geschwindigkeit der Phosphodiester-Hydrolyse im Rahmen der DNA-Spaltung liegt mit einem ermittelten k_{cat} -Wert der Größenordnung 0.001 s^{-1} deutlich unter dem typischer Typ II Restriktionsenzyme ($k_{cat} \approx 0.01$ bis 0.1 s^{-1} ; Pingoud *et al.*, 1993), aber über dem einer typischen *homing*-Endonuklease (PI-*SceI*: $k_{cat} \leq 0.0001 \text{ s}^{-1}$; Wende *et al.*, 1996).

An DNA, welche die für das McrBC-System spezifischen R^mC -Elemente enthält, werden aus den Untereinheiten McrB und McrC hochmolekulare Komplexe gebildet, deren Ausbildung möglicherweise Voraussetzung für die Hervorbringung einer DNA-Spaltaktivität durch das McrBC-Restriktionsenzym ist (Krüger *et al.*, 1995b). *In vivo* ist an der Bildung dieser Komplexe zusätzlich die N-terminal verkürzte Form von McrB, McrB_s, beteiligt (Beary

et al., 1997). Da *in vitro* für eine DNA-Spaltung die Anwesenheit von McrB_s nicht erforderlich ist, können katalytisch aktive McrBC-Komplexe jedoch auch ohne dieses Protein gebildet werden (Sutherland *et al.*, 1992). Obwohl die Untereinheit McrC als möglicher Ort des aktiven Zentrums des McrBC-Komplexes diskutiert wird, welcher die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung bewirkt, besitzt dieses Protein selbst keine DNA-Bindungseigenschaften (Krüger *et al.*, 1995b). Diese sind auf den N-terminalen Teil von McrB beschränkt (Gast *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur DNA-Spaltung, die für lineare DNA-Substrate das Vorhandensein von zwei räumlich getrennten McrBC-Erkennungssequenzen benötigt, die mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{ass}} \simeq 10^7 \text{ M}^{-1}$ gebunden werden, reicht für eine schwächere DNA-Bindung durch die Untereinheit McrB das Vorliegen einer einzigen spezifischen R^mC-Sequenz aus. Untersuchungen der DNA-Bindung durch McrB mit Substraten, die nur eine R^mC-Sequenz in unterschiedlichem Kontext enthalten, zeigten eine höhere Affinität von McrB zu A^mC- als zu G^mC-Elementen (Gast *et al.*, 1997). Die Komplexe dieser Bindung unterscheiden sich qualitativ nicht von den hochmolekularen McrB-Komplexen, die an DNA-Molekülen mit zwei getrennten Erkennungssequenzen gebildet werden. Im Gegensatz dazu bindet McrB nur mit einer geringen Affinität an DNA, die keine Erkennungssequenz für das McrBC-System enthält (unspezifische DNA). In diesem Fall werden lediglich niedermolekulare Proteinkomplexe an der DNA gebildet (Krüger *et al.*, 1995b). Obwohl zum Erzielen einer DNA-Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem essentiell erforderlich, soll die Anwesenheit der McrC-Untereinheit die DNA-Bindungseigenschaften von McrB nicht beeinflussen (Krüger *et al.*, 1995b). Im Gegensatz dazu wird die DNA-Bindung von McrB durch die Anwesenheit des Kofaktors GTP in geringem Maße verstärkt (Krüger *et al.*, 1995b), was darauf hinweist, das GTP die Ausbildung der McrB/McrC-Komplexe auf der DNA zu modulieren vermag. Es ist weder bekannt, aus welcher Anzahl an McrB- und McrC-Untereinheiten sich ein DNA-spaltaktiver McrBC-Enzymkomplex zusammensetzt, noch wieviele Kofaktoren (GTP-Moleküle, Magnesiumionen) daran beteiligt sind. Die DNA-Spalteffizienz des McrBC-Systems ist *in vitro* optimal, wenn das Mengenverhältnis von McrB zu McrC 1 : 1 (Krüger *et al.*, 1995b; Pieper *et al.*, 1997) bzw. 3 : 1 bis 5 : 1 (Panne *et al.*, 1998) beträgt.

2.4.4. GTP-Abhängigkeit der DNA-Spaltung durch McrBC

In Abwesenheit des Kofaktors GTP ist das McrBC-Restriktionssystem auch unter sonst optimalen DNA-Spaltbedingungen nicht in der Lage, lineare DNA hydrolytisch zu spalten

(Sutherland *et al.*, 1992). Damit ist McrBC das einzige bekannte Restriktionsenzym, das GTP-abhängig ist. Weder GDP, GMP, nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga (wie z. B. GTP- γ S), noch ATP können als Kofaktor eine DNA-Spaltung durch McrBC hervorrufen.

Unklar ist, wofür die GTP-Hydrolyse notwendig ist. Die spezifische DNA-Bindung durch McrB wird durch den Zusatz von GTP zwar verstärkt, erfolgt prinzipiell aber auch in Abwesenheit von GTP. Daher spielt das GTP vermutlich bezüglich der DNA-Spaltung eine entscheidende Rolle. Wie oben beschrieben, ist neben einem regulatorischen Effekt, analog zu den G-Proteinen, denkbar, dass die GTP-Hydrolyse für die DNA-Spaltreaktion notwendig ist oder dieser vorausgehen muss, z. B. im Rahmen einer DNA-Translokation, analog zum Mechanismus der Typ I R/M-Systeme. Der k_{cat} -Wert der intrinsischen GTP-Hydrolyse beträgt 0.05 s^{-1} und kann in geringem Maße durch DNA, stärker noch durch die Anwesenheit von McrC im Verhältnis 1 : 1 bis auf den 30-fachen Wert gesteigert werden. Damit ist der GTP-Umsatz durch McrBC deutlich größer als der der Phosphodiester-Hydrolyse, dessen k_{cat} -Wert in der Größenordnung 0.001 s^{-1} liegt (Pieper *et al.*, 1997).

3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Restriktionsendonuklease McrBC besitzt eine ungewöhnliche Kombination von Eigenschaften, durch die sie nicht in die definierten Typengruppen der Restriktionssysteme passt. Als einziges bekanntes GTP-abhängiges Restriktionsenzym erweitert McrBC das Funktionsspektrum der GTPasen um den Aspekt der Wechselwirkung mit DNA. In der hier vorliegenden Arbeit sollten Studien zur DNA-Bindung und -Spaltung durch das McrBC-System durchgeführt werden, die zu einer Charakterisierung der Wechselwirkung der McrBC-Restriktionsendonuklease mit DNA sowie zu der Entwicklung eines Modells zur DNA-Bindung und -Spaltung durch McrBC beitragen.

Hierzu sollten die Proteine McrB und McrC aufgereinigt und durch *in-vitro*-Experimente mit verschiedenen DNA-Substraten untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte die Anwendung unterschiedlicher experimenteller Methoden die Anforderungen der McrBC-Restriktionsendonuklease an das DNA-Substrat bezüglich Bindung und Spaltung klären. Für die *in-vitro*-Analyse der Wechselwirkung von McrBC mit DNA sollten verschiedene, unterschiedlich modifizierte DNA-Substrate hergestellt und aufgereinigt werden. Weiterhin sollten in dieser Arbeit Hinweise über den Aufbau DNA-spaltaktiver McrBC-Komplexe auf der DNA gewonnen werden, was durch eine zusätzliche Analyse der Eigenschaften von Deletionsvarianten des McrB-Proteins unterstützt werden sollte. Desweiteren sollte die Bestimmung der Positionen, an denen die McrBC-Restriktionsendonuklease die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat vollzieht, zu der Charakterisierung der DNA-Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem beitragen. Aus den erhaltenen Ergebnissen dieser Arbeit sollte unter Einbeziehung der vorhandenen Kenntnisse ein Modell zur DNA-Bindung und -Spaltung durch die Restriktionsendonuklease McrBC entwickelt werden.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit angewandten experimentellen Methoden und die dafür verwendeten Materialien näher beschrieben. Methoden, die in der modernen Laborarbeit als Standardverfahren üblich sind, werden nicht näher beschrieben und wurden gemäß der angegebenen Literaturstelle durchgeführt.

1. Materialien

Für alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biomoleküle und Geräte ist der Firmenname des Herstellers und dessen Firmensitz angegeben. Sofern nicht anders vermerkt, beziehen sich die Ortsangaben der Bezugsquellen auf deutsche Städte.

1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien haben den Reinheitsgrad *pro analysi* und stammen überwiegend von der Firma Merck (Darmstadt) sowie zum Teil von Applichem (Darmstadt), BTS (Darmstadt), Flucka (Deisenhofen), Life Technologies (Karlsruhe), Oncor Appligene (Heidelberg), Riedel de Haën (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), SERVA (Heidelberg) und Schmidt (Dillenburg). Auf weitere Bezugsquellen wird an entsprechenden Stellen verwiesen.

1.2. Wasser

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wird über ein Seralpur PRO 90 CN Reinstwassersystem mit einem Filterset Typ 'HPLC' (Art. Nr. 2388) der Firma Seral (Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Dabei wird das Wasser durch je einen Aktivkohle- und Adsorberharz-Einsatz in der Reinstwasseranlage sowie anschließende Filtrierung durch einen Sterilfilter Supor DCF der Firma Gelman Sciences (Dreieich) mit einer Porengröße von 0.2 μm gereinigt und durch 2 Ionentauscher-Einsätze in der Reinstwasseranlage entionisiert (resultierende Leitfähigkeit 0.05 - 0.1 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$). Zusätzlich wird Wasser, welches für biochemische Reaktionsansätze oder mikrobiologische Arbeiten eingesetzt werden soll,

mindestens 30 min bei 121 °C und 2.5 bar in einem Autoklaven Tecnomara der Firma Integra Biosciences (Fernwald) autoklaviert.

1.3. Antibiotika

Die Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien oder auf Agar-Festmedien erfolgt unter sterilen Bedingungen, d. h. Kontaminanten werden durch zuvor sterilisierte Materialien und entsprechende Arbeitsweise von der gewünschten Bakterienkultur ferngehalten. Zur Sicherheit tragen die gewünschten Bakterienklone mindestens ein plasmidcodiertes Antibiotikum-Resistenzgen, so dass durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in das Nährmedium einer bakteriellen Kontamination zusätzlich vorgebeugt wird. Zusätzlich ist das Plasmid, das für die Antibiotikumresistenz codiert, zugleich Träger einer gewünschten DNA-Sequenz, die beispielsweise einen Promotor und ein anschließendes Gen für ein zu exprimierendes Protein enthält. Andere gewünschte DNA-Sequenzen, die im Plasmidvektor lokalisiert sein können, sind Sequenzen, die als Substrat-DNA für Enzymkinetiken nutzbar gemacht werden sollen, oder welche, die für Klonierungszwecke oder als *template*-Vorlage für DNA-Amplifikation Verwendung finden sollen. Durch die Lokalisation dieser Elemente auf einem Plasmid, das auch eine Antibiotikum-Resistenz trägt, wird durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in das Nährmedium der Bakterienkultur ein Selektionsdruck zur Erhaltung des Plasmides in den Bakterien ausgeübt und damit die gewünschte DNA-Sequenz erhalten.

In der vorliegenden Arbeit finden die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol Verwendung.

1.3.1. Ampicillin

Das synthetische, wasserlösliche β -Lactam-Antibiotikum (Dinatriumsalz $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, $M = 371.4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) inhibiert die bakterielle Zellwandsynthese bei wachsenden Zellen. Dies geschieht aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Ampicillin zu D-Alanyl-D-alanin durch eine Reaktion des Ampicillins mit der D-Alanin-Transpeptidase unter Öffnung des β -Lactam-Rings, als deren Folge die D-Alanin-Transpeptidase irreversibel blockiert wird. So können die Glykanstränge der neu synthetisierten Zellwand nicht vernetzt werden, und die Zellwand besitzt dadurch nicht die erforderliche Stabilität (Mutschler, 1986). Bei Zellen von *Escherichia coli*, die keine Resistenz gegen dieses Antibiotikum besitzen (z. B. in Form der durch das *bla*-Gen codierten β -Lactamase, die durch Öffnung des β -Lactam-Rings die

antibakterielle Wirkung des Ampicillins aufhebt; NCBI *Protein ID*: AAA57090.1), führt Ampicillin schon bei Konzentrationen ab $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ zur Wachstumshemmung (Angabe von Merck, Darmstadt).

Ampicillin wird in dieser Arbeit in einer Konzentration von $75 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Flüssigmedien bzw. $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Agar-Festmedien zur Plasmid-Selektion verwendet. Die in Wasser angesetzt und durch einen Sterilfilter Minisart (Art. Nr. 16534) der Firma Sartorius (Göttingen) mit einer Porengröße von $0.2 \mu\text{m}$ filtrierten Stammlösungen besitzen eine Konzentration von $25 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ und werden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bezugsquelle für Ampicillin als Dinatriumsalz: Firma Merck (Darmstadt).

1.3.2. Chloramphenicol

Das ursprünglich aus *Streptomyces venezuelae* isolierte und heute synthetisch hergestellte Chloramphenicol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, $M = 323.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) inhibiert die bakterielle, mitochondrielle und chloroplastische Proteinsynthese durch Blockierung der Aminoacyl- und Peptidyl-Stellen des 70S-Ribosoms. Dadurch ist die Peptidyltransferase-Reaktion in der Elongationsphase gehemmt (Singer & Berg, 1991). Bei Zellen von *Escherichia coli*, die keine Resistenz gegen dieses Antibiotikum besitzen (z. B. in Form der Chloramphenicol-Acetyltransferase, CAT; NCBI *Protein ID*: CAA25629.1), führt Chloramphenicol schon bei Konzentrationen ab $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ zur Wachstumshemmung (Angabe der Firma Merck, Darmstadt).

Chloramphenicol wird in dieser Arbeit in einer wirksamen Konzentration von $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Flüssigmedien bzw. $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Agar-Festmedien zur Plasmid-Selektion verwendet. Die in Ethanol angesetzten Stammlösungen besitzen eine Konzentration von $10 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ und werden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bezugsquelle für Chloramphenicol: Firma Merck (Darmstadt).

1.4. Nährmedien für Bakterienkulturen

Für verschiedene molekularbiologische Arbeiten ist es notwendig bzw. hilfreich, bestimmte DNA-Sequenzen in Plasmidvektoren zu klonieren und die Plasmide durch Transformationsverfahren in Bakterien einzuschleusen. Die Kultivierung der Bakterien erlaubt eine Selektion, Vermehrung, Aufarbeitung, Lagerung und Expression der DNA.

Zur Vermehrung der DNA sowie zur Expression von plasmidcodierten Proteinen werden die Bakterienklone in Flüssigmedien, zur Selektion und Lagerung auf Agar-Festmedien kultiviert.

1.4.1. LB-Flüssigmedium

Zur Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia-coli*-Stämme wird das Vollmedium nach S. E. Luria und G. Bertani verwendet. Das unter dem Namen LB-Medium bekannte Flüssigmedium enthält $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Pepton (Caseinhydrolysat), $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Hefeextrakt und $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Die Lösung wird mit Reinstwasser angesetzt, mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt und autoklaviert. Die so vorbereitete Lösung kann vor ihrer Verwendung bei Raumtemperatur mehrere Tage bis Wochen gelagert werden.

Frisch vor der Verwendung wird dem Flüssigmedium ein zur Selektionierung des zu kultivierenden Bakterienklons geeignetes Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration hinzugesetzt.

Die Volumina der Medien betragen je nach Zweck der Kultivierung zwischen 3 ml, z. B. als Ausgangsmaterial für Plasmid-Isolierungen im Kleinformat (Plasmid-Minipräparationen) oder zur Überprüfung von induzierbaren Protein-Expressionen, bis 500 ml für präparative Zwecke, z. B. für eine Proteinaufreinigung oder zur Gewinnung von Plasmiden als Substrat-DNA oder für Klonierungs-Präparationen.

1.4.2. SOB-Medium

Das SOB-Flüssigmedium wird bei der Herstellung kalziumkompetenter Zellen (s. S. 63) verwendet. Es enthält $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Pepton (Caseinhydrolysat), $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Hefeextrakt, $0.6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $0.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ sowie $1.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ MgSO_4 und wird mit NaOH auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt. Nach den Autoklavieren wird es bei Raumtemperatur gelagert und ist so mehrere Tage bis Wochen haltbar.

1.4.3. SOC-Medium

Dieses Flüssigmedium findet als erstes Nährmedium für Bakterien nach einer Elektrotransformation Verwendung, bevor diese auf ein Festmedium ausplattiert werden. Es besteht aus $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Pepton (Caseinhydrolysat), $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Hefeextrakt, $7.4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, $3.6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Glucose und 0.05 % (v/v) Phytinsäure in einer mit Reinstwasser angesetzten Lösung. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7.0 wird das Medium autoklaviert und kann mehrere Tage bis Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Das SOC-Medium wird ohne Zusatz von Antibiotikum in Volumina von ca. 1 ml verwendet, in denen die transformierten Bakterienzellen für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln (Mixer 5432, Fa. Eppendorf) inkubiert werden.

1.4.4. Agar-Festmedien

Sollen Bakterienkulturen auf festem Boden wachsen, verwendet man Agar-Festmedien. In diesem Falle setzt man dem oben beschriebenen LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) Bacto-Agar hinzu. Nach dem Autoklavieren wird das Medium in sterile Petrischalen gegossen, in denen der Agar beim Erkalten fest wird.

Die Agar-Festmedien können auch durch Zusatz eines Antibiotikums als Selektivmedium verwendet werden. Hierzu wird das Antibiotikum nach dem Autoklavieren unmittelbar vor dem Gießen der Platten in die abgekühlte, aber noch nicht erstarrte Agar-LB-Lösung (Temperatur etwa 50 °C) gegeben.

Die Agar Festmedien werden bei 4 °C gelagert und sind so mehrere Tage bis Wochen verwendungsfähig.

1.5. Bakterienstämme

Die Vermehrung von Plasmiden, die als *template* für PCR, als Substrat für Spaltungsuntersuchungen oder für Klonierungen verwendet werden, sowie die Expression der Proteine des McrBC Restriktionssystems und dessen Derivaten erfolgt in Bakterien der Art *Escherichia coli* (kurz: *E. coli*; NCBI *Taxonomy ID*: 562, näheres zu NCBI s. S. 246). Dieses gramnegative, 6 µm lange, stäbchenförmige Enterobakterium ist der weltweit am intensivsten untersuchte Mikroorganismus, sein Genom wurde 1997 vollständig sequenziert (*E. coli* K-12; NCBI *Taxonomy ID*: 83333, Blattner *et al.*, 1997).

Von *E. coli* existieren verschiedene Stämme (Bakterienklone, die von einem ursprünglichen Isolat abstammen), deren Genotypen für die Arbeit im Gen-Labor sowohl auf dem Wege der klassischen Genetik als auch durch DNA-Rekombinationstechniken in verschiedenster Weise modifiziert wurden. Dies geschah einerseits mit dem Ziel, die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, daß sie außerhalb ganz spezieller Versuchsbedingungen, die in der Natur normalerweise nicht vorkommen, überleben oder sich ausbreiten, andererseits um bestimmte Experimente (insbesondere Klonierungen und Induktionen) überhaupt erst möglich zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *E.-coli*-Stämme verwendet:

1.5.1. TC410

Der *E.-coli*-Stamm TC410 ist ein Derivat des Stammes DS410 (ein Abkömmling des Sicherheitsstammes *E. coli* K-12; Dougan, & Sherratt, 1977; Noyer-Weidner *et al.*, 1986; Woodcock *et al.*, 1988), dem aufgrund von Deletionen mehrere Restriktionsfunktionen fehlen. So besitzen die Bakterien dieses Stammes weder Proteine, die an der Ausbildung des McrBC-Phänotyps beteiligt sind, noch sonstige cytosinmodifikationsabhängige Enzyme. Aus diesem Grunde wird der Stamm TC410 in dieser Arbeit für zweierlei Zwecke verwendet: als Expressionssystem für Proteine des McrBC-Systems oder zur Vermehrung und *in-vivo*-Methylierung von Substratplasmiden.

Der Stamm besitzt folgenden Genotyp: *mcrA*⁻, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)201$, *minA*, *minB*, *rpsL*, *sup*⁺ (Noyer-Weidner *et al.*, 1986; Heitman & Model, 1987; Woodcock *et al.*, 1989; Krüger *et al.*, 1992).

Der Genotyp *rpsL* bedeutet eine Mutation in der S12-Untereinheit des 30S-Ribosoms. Dadurch kann das Antibiotikum Streptomycin nicht mehr an die 30S-Untereinheit des Ribosoms binden, was den Bakterienstamm gegen Streptomycin resistent werden läßt.

Der Stamm TC410 wurde von M. Hahn bereits im Rahmen von Untersuchungen verschiedener McrB-Expressionstests verwendet (Hahn, 1991) und für die hier vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.5.2. TAT2265

Der Stamm TAT2265 (pBW5) ist ein Derivat von *E. coli* K-12 und wurde von J. Walter, MPI für Molekulare Genetik, Berlin, für eine Präparation des Plasmids pBW5 freundlicherweise überlassen. Da keine detaillierte Beschreibung des Genotyps von TAT2265 vorliegt, werden Bakterien dieses Stammes in dieser Arbeit lediglich für die Präparation des Plasmids pBW5 (vgl. S. 47) verwendet. Hierzu wird in der Flüssigkultur von TAT2265 die durch pBW5 codierte Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion verwendet.

1.5.3. BL21(DE3)

Der *E.-coli*-Stamm BL21 ist ein Abkömmling des Sicherheitsstammes *E. coli* B (NCBI *Taxonomy ID*: 37762), dessen Zellen keine OmpT-Protease in ihrer Außenmembran besitzen. Dadurch ist dieser Stamm für Protein-Expression mit anschließender Aufreinigung sehr geeignet. Das Derivat BL21(DE3) trägt das chromosomal integrierte, *lacUV5*-kontrollierte Gen für die T7-Polymerase des Bakteriophagen DE3, einem λ -Abkömmling. Auf diese Weise

können durch Verwendung von Expressions-Vektoren, deren Gene durch den Promoter des T7-Bakteriophagen reguliert werden, hohe Protein-Expressionsraten erzielt werden (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990; Weiner *et al.*, 1994)

Der in dieser Arbeit verwendete BL21(DE3)-Stamm besitzt das Plasmid pLysS, ein Derivat des Klonierungsvektors pACYC184 (NCBI *Taxonomy ID*: 38738; Chang & Cohen, 1978), das in dessen *Bam*HI-Schnittstelle das Lysozym-Gen des T7-Bakteriophagen trägt sowie dessen Chloramphenicol-Resistenzgen besitzt (Studier *et al.*, 1990).

Der Genotyp von *E. coli* BL21(DE3)pLysS ist: F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal λ*(DE3) [pLysS Cam^r] (Angaben der Firma Stratagene, La Jolla, USA), mit λ (DE3) $\equiv \lambda$ cI_{ts}857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5 T7Gen1* (Studier & Moffatt, 1986).

1.6. DNA

In dieser Arbeit wurden verschiedene "Typen" von DNA verwendet, die sich in der Art ihrer Entstehung sowie im Verwendungszweck unterscheiden. Voll synthetisch hergestellte Oligodesoxynukleotide, PCR-Produkte sowie Plasmide und deren Fragmente wurden als Substrate für Untersuchungen der DNA-Spaltaktivität durch das McrBC-Restriktionssystem verwendet, die Verwendung von Plasmid-Expressionsvektoren diente der *in-vivo*-Expression von Proteinen des McrBC-Systems und deren Aufreinigung.

1.6.1. Plasmide

Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind letztlich Abkömmlinge von pBR328. Das Plasmid pBR328 (Soberon *et al.*, 1980; Covarrubias *et al.*, 1981) ist ein Derivat von pBR322 (NCBI *Taxonomy ID*: 47470; Sutcliffe, 1979; Watson, 1988) und enthält dessen Replikationsursprung von ColE1 (NCBI *Taxonomy ID*: 2443; Tomizawa *et al.*, 1977) sowie dessen Resistenzgene gegen Ampicillin (*bla*; NCBI *Protein ID*: AAA57090.1; Sutcliffe, 1978) und Tetracyclin (*tet*; NCBI *Protein ID*: AAB59735.1; Peden, 1983).

1.6.1.a. Plasmide für Proteinexpression

Für eine Charakterisierung der McrBC-Restriktionsendonuklease werden in dieser Arbeit die Untereinheiten des Restriktionssystems durch bakterielle Expressionssysteme *in vivo* produziert und aus den Bakterienzellen aufgereinigt. Hierzu werden Plasmide, die für die McrBC-Untereinheiten McrB, McrB_s oder McrC codierende Gene hinter einem von außen induzierbaren, starken Promotor enthalten, als Expressionsvektoren verwendet.

Um eine optimale Aufreinigung der Proteine zu erreichen, erfolgt deren Expression nicht in ihrer natürlichen, in *Escherichia coli* K-12 vorkommenden Primärstruktur (sog. Wildtyp-Form der Proteine, kurz *wt*), sondern als Produkt einer Fusion auf genetischer Ebene mit einer weiteren, kurzen Aminosäuresequenz oder mit einem zweiten Protein. Die Fusion mit einem solchen Anhängsel (engl.: *tag*) erlaubt eine leichte und effiziente Aufreinigung des Fusionsproteins (und somit auch des gewünschten Proteins), wenn das Anhängsel eine hohe Affinität zu einem Stoff besitzt, der von den restlichen bakteriellen Proteinen und sonstigen Makromolekülen nicht sonderlich gut gebunden wird. Dieser sog. Affinitäts-*tag* sollte so konstruiert sein, dass er nach der erleichterten Aufreinigung vom gewünschten Protein durch proteolytische Spaltung abgespalten werden oder am Protein verbleiben kann, wenn er dessen zu untersuchende Funktion nicht maßgeblich beeinträchtigt.

In dieser Arbeit werden McrB, McrB_s und McrC als Fusionsproteine mit einem Affinitäts-*tag* exprimiert, der entweder aus sechs zusätzlichen Histidinresten (His₆-*tag*) oder aus dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST-*tag*) besteht. Die Aminosäuresequenzen beider Anhängsel sind in den verwendeten Plasmiden von der Promotorregion aus unmittelbar vor (d. h. 5' zu) oder hinter (d. h. 3' zu) dem entsprechendem Gen codiert, so dass sie entweder N- oder C-terminal am gewünschten Protein sitzen.

pBN211

Das Plasmid pBN211 ist ein Derivat des Expressionsvektors pGEX-2T (NCBI *GenBank* Registrierungsnummer U13850.1; Malone, 1994). Das Plasmid pGEX-2T besitzt ein Gen, das für den C-terminalen Teil der Glutathion-S-Transferase (GST; NCBI *Protein ID*: AAA57089.1) aus *Schistosoma japonicum* codiert (Smith *et al.*, 1986) und durch den *tac*-Promotor, einer synthetischen Kombination aus einem Promotor des Bakteriophagen T7 und zwei *lac*-Operatorsequenzen, kontrolliert wird. Der *tac*-Promotor erlaubt zum einen eine effektive Repression des Gens durch das Lac-Protein (ebenfalls plasmidcodiert im Gen *lacI^q*; NCBI *Protein ID*: AAA57091.1), zum anderen aber durch Zugabe von Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) eine starke Transkription. Für Selektionszwecke besitzt das Plasmid ein Resistenzgen (*bla*, codiert für β -Lactamase; NCBI *Protein ID*: AAA57090.1) gegen das Antibiotikum Ampicillin.

In pGEX-2T wurde in die singuläre *EcoRI*-Schnittstelle ein etwa 1.5 kbp großes Fragment des *mcrBC*-Operons eingesetzt (Krüger, 1992), das das *mcrB*-Gen enthält, und damit das 6405 bp große Plasmid pBN211 zur Expression von GST-McrB generiert: Nach Excision des Fragmentes aus dem *mcrBC*-Lokus mit den Restriktionsenzymen *EspI* (erkennt und schneidet

die Sequenz 5'-GC↓TNAGC) und *NsiI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-ATGCA↓T) und Ergänzung des einzelsträngigen 5'-Überhanges der *EspI*-Schnittstelle zu einem Doppelstrang bzw. Entfernung des einzelsträngigen 3'-Überhanges der *NsiI*-Schnittstelle wurde eine *blunt-end*-Ligation mit den ebenfalls zu Doppelsträngen aufgefüllten Enden der *EcoRI*-Schnittstellen (*EcoRI* erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓AATTC) durchgeführt und auf diese Weise ein Fusionsgen erzeugt (pBN211 enthält zusätzlich noch eine stille Mutation). Als Genprodukt entsteht nach Transkriptionsinduktion durch IPTG ein 696 Aminosäurereste umfassendes Fusionsprotein, bestehend aus einer N-terminale GST-Domäne und C-terminalem McrB. Solche GST-Fusionsproteine lassen sich leicht mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatografie aufreinigen (Smith & Johnson, 1988). Zwischen beiden Domänen befindet sich eine über den pGEX-2T Klonierungsvektor eingebrachte Arg-Gly Sequenz, die eine proteolytische Spaltung durch Thrombin und somit eine Abtrennung der GST-Domäne von McrB ermöglicht (Eaton *et al.*, 1986).

Die Nukleotidsequenz von pBN211 ist im Anhang (s. S. 277) aufgeführt.

pBN213

Das Plasmid pBN123 ist ähnlich konstruiert wie das Plasmid pBN211, leitet sich aber von dem pGEX-2T Derivat pGEX-3T ab und enthält anstelle von *mcrB* das *mcrC*-Gen. Der Klonierungsvektor pGEX-3T (Smith & Johnson, 1988) bringt zwischen die N-terminale GST-Domäne und den gewünschten C-terminalen Proteinteil noch eine Stelle für eine mögliche proteolytische Spaltung durch die Serinprotease Faktor X_a in das Fusionsprotein ein (Fujikawa *et al.*, 1972; Nagai & Thogersen, 1984), entspricht aber ansonsten in seinen Eigenschaften dem oben beschriebenen Klonierungsvektor pGEX-2T.

Konstruiert wurde das Plasmid pBN213 über Insertion des etwa 1.2 kbp großen *AvaII/StuI*-Fragmentes aus dem *mcrBC*-Operon (Krüger, 1992). Hierzu wurde nach Ergänzung des einzelsträngigen 5'-Überhanges der *AvaII*-Schnittstelle (5'-G↓GWCC; *StuI* erzeugt *blunt ends*: 5'-AGG↓CCT) zu einem Doppelstrang das *mcrC*-enthaltende Fragment durch *blunt-end*-Ligation in die *SmaI*-Schnittstelle (5'-CCC↓GGG) von pGEX-3T eingefügt. Analog zu pBN211 wird durch Zugabe von IPTG in eine Bakterienkultur, die den Expressionsvektor pBN213 besitzt, die Expression eines GST-Fusionsproteins induziert, hier GST-McrC.

Die Nukleotidsequenz von pBN213 ist in Anhang (s. S. 280) aufgeführt.

pGSTMcrBs

Das Plasmid pGSTMcrBs ist ein Expressionsvektor für ein GST-McrB_s-Fusionsprotein und leitet sich unmittelbar von dem oben beschriebenen Plasmid pBN211 ab. Das Plasmid wurde

von U. Pieper (Gießen) auf folgendem Weg konstruiert: Nach der Entfernung des *mcrB*-Gens aus dem Vektor pBN211 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓GATCC, die in der im Anhang auf S. 277 gezeigten Sequenz von pBN211 bei Pos. 930 beginnend zu finden ist) und *Aat*II (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-GACGT↓C, in pBN211 bei Pos. 2677 beginnend) wurde in den so entstandenen Plasmidrahmen ein mit den gleichen Restriktionsenzymen zurechtgeschnittenes PCR-Produkt einligiert, das basierend auf der Sequenz von pBN211 unter Verwendung eines *forward-primers* (*primer* sind kurze DNA-Einzelstränge, die einen Reaktionsbeginn der DNA-Polymerase bei der PCR ermöglichen, vgl. S. 81) mit der Sequenz 5'-AATTGGATCC TCAAAAAGT AATCATAAC-3', die ab der zehnten Base der pBN211-Sequenz im Bereich von Pos. 1455 bis Pos. 1472 entspricht und im Bereich 3' hierzu eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, und eines *reverse-primers* mit der die *Aat*II-Schnittstelle enthaltenden Sequenz 5'-TTAAGTCGAC GTCTAAGAAA CCATTAT, der ab der achten Base komplementär zu der Sequenz des Bereiches von Pos. 2663 bis Pos. 2682 der gezeigten pBN211-Sequenz ist, amplifiziert wurde. Durch diese genetische Manipulation wurde der für den N-terminalen Teil von McrB codierende Sequenzbereich deletiert, so dass sich der für McrB_s codierende Genabschnitt von *mcrB* unmittelbar an die für die GST-Domäne codierende Sequenz anschließt.

pHisMcrBs

Das Plasmid pHisMcrBs ist ein Expressionsvektor für das Protein McrB_s, welches mit einer N-terminalen Erweiterung um 6 Histidinreste für eine erleichterte affinitätschromatische Aufreinigung exprimiert wird. Dieses Plasmid wurde von U. Pieper (Gießen) aus dem Expressionsvektor pHisRV und einem durch PCR amplifizierten Abschnitt aus dem Gen *mcrB* konstruiert. Die Sequenz von pHisMcrBs ist in Anhang aufgeführt (s. S. 284).

Der Expressionsvektor pHisRV (Wende, 1995; Wende *et al.*, 1996) enthält hinter einem *tac*-Promotor, der eine IPTG-induzierbare Überexpression des 3'-folgenden Gens ermöglicht, das Gen für die Restriktionsendonuklease *EcoRV*. Das 5'-Ende von *ecoRV* trägt nach dem Initiationscodon ATG die Erweiterung 5'-CATCATCATC ACCATCAC-3', die für sechs Histidinreste kodiert. Diese Abfolge von sechs Histidinresten am N-Terminus des *EcoRV*-Proteins wird als His₆-Affinitäts-*tag* bezeichnet. Der His₆-*tag* erlaubt eine relativ leichte Aufreinigung des Enzyms durch Affinitätschromatografie an einer Nickelchelataragrose-Säule und hat nur einen geringen Effekt (Faktor 2 bis 5) auf die Aktivität des Enzyms.

In pHisMcrBs ist das Gen *ecoRV* durch eine Sequenz aus dem *mcrB*-Gen ersetzt, die für das Protein McrB_s codiert. Dafür wurde nach der Entfernung des *ecoRV*-Gens aus dem Vektor pHisRV mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓GATCC-3', die in der im Anhang auf S. 284 gezeigten Sequenz von pHisMcrBs bei Pos. 22 beginnend zu finden ist) und *Sal*I (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓TCGAC-3', in pHisMcrBs bei Pos. 1250 beginnend) in den so entstandenen Plasmidrahmen ein mit den gleichen Restriktionsenzymen zurechtgeschnittenes PCR-Produkt einligiert, das wie bei der Beschreibung der Generierung von pGSTMcrBs erzeugt wurde (der dort beschriebene *reverse-primer* bringt die zur Klonierung notwendige *Sal*I-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein). Durch diese genetische Manipulation wurde, wie auch schon im Falle von pGSTMcrBs, der für den N-terminalen Teil von McrB codierende Sequenzbereich deletiert, so dass sich der für McrB_s codierende Genabschnitt von *mcrB* unmittelbar an die für die sechs Histidinreste codierende Sequenz anschließt.

pBBImcrB

Der Expressionsvektor pBBImcrB enthält das *mcrB*-Gen, das unter der Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren Promotors des Bakteriophagen T7 steht und am N-Terminus durch eine Sequenz, die für sechs Histidinreste codiert, erweitert ist. Der Vektor wurde von F-U. Gast aus pBBInucA (Meiss *et al.*, 1998) konstruiert, einem Derivat von pET-3d (Studier *et al.*, 1990). Dafür wurde aus pBBInucA mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓GATCC-3') und *Nde*I (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-CA↓TATG-3') das im Vektor enthaltene *nucA*-Gen entfernt und in den so entstandenen Plasmidrahmen ein mit den gleichen Restriktionsenzymen zurechtgeschnittenes PCR-Produkt einligiert, das das *mcrB*-Gen enthält. Dieses Insert entstand durch PCR, basierend auf pBN211, mit einem die Sequenz der *Nde*I-Schnittstelle enthaltenden *forward-primer*, bestehend aus der Sequenz 5'-GATACATATG GAATCTATTC AACCTG-3', und einem die Sequenz der *Bam*HI-Schnittstelle enthaltenden *reverse-primer*, bestehend aus der Sequenz 5'-ATATGGATCC TATGAGTCCC CTAATAAT-3' (Pieper *et al.*, 1999a). Der *forward-primer* entspricht ab seiner 7. Base der im Anhang auf S. 277 angegebenen Sequenz von pBN211 von Pos. 968 bis Pos. 988, der *reverse-primer* ist ab seiner 10. Base komplementär zu dem Bereich von Pos. 2330 bis Pos. 2348 der gezeigten Sequenz von pBN211.

Auf diese Weise besitzt das 3.6 kbp Plasmid pBBImcrB noch das *bla*-Gen der β -Lactamase aus pBBInucA, das dem Träger des Vektors eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht. Zusätzlich exprimiert der Vektor noch als Relikt des Plasmides

pBBInucA das Inhibitorprotein NuiA der unspezifischen Endonuklease NucA aus *Anabaena* sp. PCC 7120. Die Koexpression von NuiA hat jedoch keinen Einfluss auf His₆-McrB.

1.6.1.b. Substratplasmide

Zur Untersuchung der DNA-Spaltung durch das Restriktionssystem McrBC werden u. a. Plasmide als Substrat verwendet, die zuvor durch DNA-Methyltransferasen an bestimmten Cytosinresten *in vivo* modifiziert werden. Wichtiges Untersuchungsmaterial ist hierfür das Plasmid pBW201, das für weitergehende Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mehrfach durch Deletionen und Insertionen im Methylierungsmuster abgeändert wird. Neben synthetisch hergestellten Oligodesoxynukleotiden dient auch das Plasmid pBW5 als Material zur Herstellung der pBW201-Derivate.

pBW201

Das 4853 bp große Plasmid pBW201 besitzt neben dem ColE1-Replikationsursprung und den Antibiotika-Resistenzgenen aus pBR328 das *hsmFI*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das für die DNA-Methyltransferase *M.BsuFI* codiert. *M.BsuFI* ist eine 409 Aminosäurereste große m⁵C-Methyltransferase, die mit 5'-CCGG-3' die gleiche DNA-Sequenz erkennt wie die m⁵C-Methyltransferasen *M.HpaII* aus *Haemophilus parainfluenzae* und *M.MspI* aus *Moraxella* species. Im Gegensatz zur *HpaII*-Methylase, die das zweite Cytosin der Erkennungssequenz zu 5-Hydroxymethylcytosin modifiziert (Mann & Smith, 1977; Mi & Roberts, 1992), methylieren *M.MspI* (Jentsch *et al.*, 1981) und *M.BsuFI* (Walter *et al.*, 1990) das erste Cytosin.

Nach Transformation des Plasmids pBW201 in Bakterienzellen werden durch die konstitutive Expression der *BsuFI*-Methyltransferase *in vivo* alle 5'-CCGG-3' Sequenzen zu 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin) modifiziert. Da sich aus der *M.BsuFI*-Methylierung der Sequenz 5'-RCCGG-3' zu 5'-RMCGG-3' Erkennungssequenzen für das cytosinmodifikationsabhängige McrBC-Restriktionssystem (5'-R^mC-3') ergeben, kann das Plasmid nicht in Zellen erhalten werden, die das Restriktionssystem McrBC besitzen. Die Verteilung der *M.MspI*-Erkennungssequenzen im Plasmid pBW201 und die sich daraus ergebenden Erkennungssequenzen des McrBC-Restriktionssystems sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Basensequenz von pBW201 ist im Anhang aufgeführt (vgl. S. 282).

Das Plasmid pBW201 dient als Substrat für *in-vitro*-Analysen der DNA-Spaltung durch die McrBC-Restriktionsendonuklease. Hierzu wird das Plasmid zuvor *in vivo* produziert und durch *M.BsuFI* methyliert, aus den Bakterienzellen aufgereinigt und zur Gewinnung besserer

Aussagekraft der Experimente mit anderen Restriktionsenzymen vorlinearisiert oder fragmentiert. Desweiteren ist das Plasmid Ausgangsmaterial zur Herstellung von weiteren Substrat-Plasmiden.

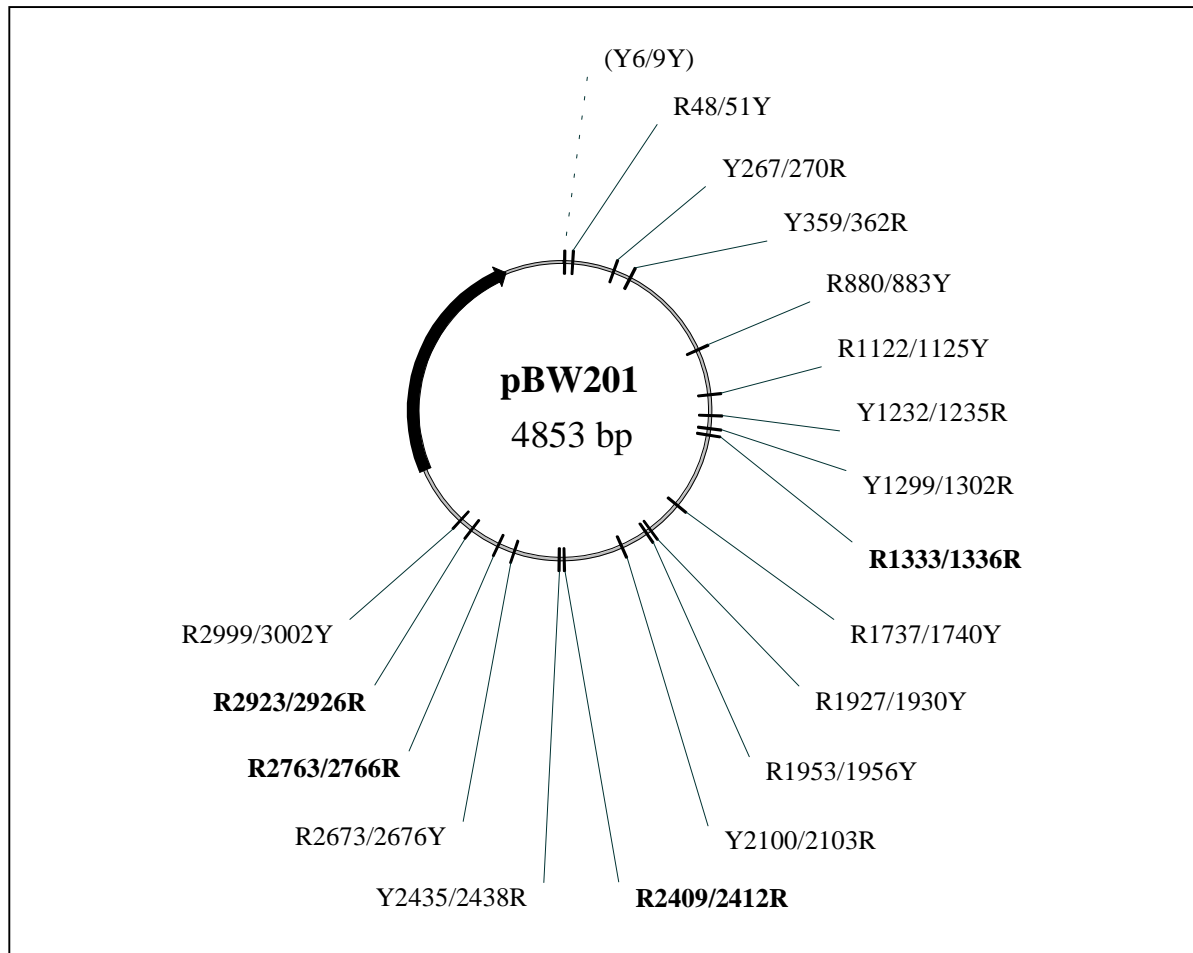


Abbildung 4: Lokalisation von 5-Methylcytosin im Substratplasmid pBW201.

Das zirkuläre Plasmid pBW201 ist schematisch als Kreis dargestellt, die relative Lage der aus einer Methylierung durch die *M.BsuFI*-Methyltransferase hervorgehenden 5-Methyl-modifizierten Cytosinreste in dem Plasmid ist mit Querstrichen durch die Kreislinie markiert. Angegeben für die markierten Positionen ist die Nummer des Basenpaares, in dem sich das 5-Methylcytosin befindet (das erste Basenpaar der einzigen vorhandenen *EcoRI*-Erkennungssequenz, 5'-GAATTC-3', trägt hierbei die Nummer 1), wobei die Positionsnummer von m⁵C-Resten, die sich im *oberen* DNA-Strang befinden, *vor* dem Schrägstrich (/) angegeben sind, die von m⁵C-Resten des *unteren* Stranges *nach* dem Schrägstrich. Bei der jeweiligen Angabe der Positionsnummer ist zusätzlich vermerkt, ob sich ein Purinrest (R) oder ein Pyrimidinrest (Y) im Nukleotid 5'-stehend zu m⁵C befindet (bei Angaben, die sich auf den *unteren* DNA-Strang beziehen, wurde das 5'-stehende Nukleotid *hinter* der Positionsnummer des m⁵C-Restes angegeben, da es eine höhere Positionsnummer besitzt als der m⁵C-Rest). Aus den Angaben ist ersichtlich, wo sich aus der *M.BsuFI*-Methylierung Erkennungssequenzen von McrBC ergeben (mit R vermerkte Positionen) oder nicht (mit Y vermerkte Positionen). Hervorgehoben ist die Lage von *M.BsuFI*-Erkennungssequenzen, aus deren vollständiger Methylierung sich gleich zwei Erkennungssequenzen von McrBC ergeben (Fettdruck) oder gar keine (Angabe in runden Klammern stehend). Der dicke, dem Kreisumriss folgende Pfeil zeigt die relative Lage des für *M.BsuFI* codierenden *hsrFI*-Gens, das in einem langen methylierungsfreien Abschnitt des Plasmids liegt.

pBW5

Das Plasmid pBW5 wurde zur Klonierung des *hsrFI*-Gens aus dem *Bacillus-subtilis*-Stamm ISF18 generiert (Kapfer *et al.*, 1991). Das Gen codiert für das zum *BsuFI*-Restriktions-/Modifikationssystem gehörende Isoschizomer der *HpaII*-Restriktionsendonuklease, *BsuFI*. Die Isolierung des Gens aus dem bakteriellen Chromosom von ISF18 erfolgte über homologe Sequenzen zwischen dem Chromosom und dem Plasmid pBRCat18, welches zunächst in das *hsrFI*-Gen des Chromosoms integriert wurde. Durch Excision aus dem Chromosom entstand die lineare Form von pBW5, welches neben dem durch die Insertion unterbrochenen *hsrFI*-Gen auch das Gen der *BsuFI*-Methyltransferase, *hsmFI*, enthält.

Da das *hsrFI*-Gen durch die homologe Integration von pBRCat18 eine große Insertion besitzt, kann von pBW5 keine intakte *BsuFI*-Restriktionsendonuklease exprimiert werden (dies ist erst nach Entfernung der Insertion möglich und wurde durch Rekonstitution von DNA-Fragmenten aus pBW5 erreicht - hierdurch entstand das Plasmid pBW55 mit intaktem *BsuFI*-R/M-System; Kapfer *et al.*, 1991), die Bildung der intakten Methylase *M.BsuFI* ist jedoch möglich. Neben den genannten Gensequenzen trägt pBW5 zusätzlich die Resistenzgene aus pBRCat18 gegen Chloramphenicol und Ampicillin (nicht jedoch gegen Tetracyclin, wie in der Dissertationsarbeit von W. Kapfer [1991] irrtümlich angegeben).

Das Plasmid pBW5 wird in dieser Arbeit nicht als Spaltsubstrat zur Untersuchung der DNA-Hydrolyseeigenschaften des McrBC-Systems verwendet. Dieses Plasmid codiert zwar, wie pBW201, für die konstitutiv exprimierbare, intakte m⁵C-Methyltransferase *M.BsuFI* und wird somit nach Transformation in eines geeigneten (d. h. McrBC-negativen) Bakterienstammes in diesem *in vivo* modifiziert, besitzt aber in großem Umfang unsequenzierte Bereiche, was eine Aussagekraft von Spaltungsexperimenten mit McrBC zunichte macht. So wird in dieser Arbeit, aus Gründen, die später erläutert werden sollen (s. Kapitel *pMcrSbI*, S. 125), nur ein sequenzierter Bereich des *hsrFI*-Gens aus pBW5 zur Derivatisierung des Plasmides pBW201 verwendet.

pMC63

Das 1935 bp große Plasmid pMC63 wurde als Substratplasmid zur Untersuchung der DNA-Spaltung des McrBC-Restriktionssystems generiert (Steward & Raleigh, 1998) und enthält nach *in-vitro*-Methylierung mit der m⁵C-Methyltransferase *M.FnuDII* aus *Fusobacterium nucleatum* D, die die Sequenz 5'-CGCG-3' zu 5'-MGCG-3' methyliert (mit M = 5-Methylcytosin; Lui *et al.*, 1979), zwei Erkennungselemente (mit je zwei 5'-G^mC-3' Sequenzen pro vollständig methylierter *M.FnuDII*-Erkennungssequenz, vgl. S. 286) von McrBC in einem

Abstand von 63 bp. Das Plasmid enthält das Chloramphenicol-Resistenzgen aus pDD34 (Dila *et al.*, 1990), einem Derivat von pACYC184 (NCBI *Taxonomy ID*: 38738; Chang & Cohen, 1978), und den ColEI-Replikationsursprung aus pUC19 (NCBI *Taxonomy ID*: 31851; Norrander *et al.*, 1983; Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Das Plasmid wurde für die vorliegende Arbeit freundlicherweise von E. Raleigh (*New England Biolabs*, Beverly, MA 01915, USA) zur Verfügung gestellt und als *template* für die Generierung von DNA-Substraten für das McrBC-Restriktionssystem durch die PCR-Methode eingesetzt.

Die Basensequenz von pMC63 ist im Anhang angegeben (s. S. 286).

pHisVDE Δ Splice

Das 4797 bp große Plasmid pHisVDE Δ Splice ist ein von W. Wende (Gießen) generiertes, direktes Derivat des Plasmids pHisPI-SceI (Wende *et al.*, 1996), einem Expressionsvektor der *homing*-Endonuklease PI-SceI aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das Plasmid pHisPI-SceI ist ein Abkömmling des Expressionsvektors pHisRV, der im Kapitel *pHisMcrBs* (vgl. S. 43) näher beschrieben wurde. Das Expressionsplasmid pHisVDE Δ Splice codiert für eine Variante der PI-SceI Endonuklease, die sog. *Deletionsvariante* Δ 453, bei der die für die Aminosäurereste Asn454 und Cys455 codierende Basensequenz deletiert wurde (pers. Mitteilung von W. Wende). In dieser Arbeit dient ein Abschnitt der Plasmidsequenz von pHisVDE Δ Splice für die Herstellung eines Substrates für die Untersuchung der DNA-Bindung des Restriktionssystems McrBC (vgl. Kapitel *Pf1793-11.10*, S. 131).

1.6.2. Oligodesoxynukleotide

In der vorliegenden Arbeit werden synthetisch hergestellte Oligodesoxynukleotide einesteils als Substrat-DNA für Experimente zur Untersuchung der DNA-Spaltungseigenschaften des McrBC-Restriktionssystems eingesetzt, anderenteils dienen sie als *primer* zur Herstellung von DNA-Substraten durch die PCR-Methode (s. S. 81).

Im Folgenden ist eine Übersicht der verwendeten Oligodesoxynukleotide unter Angabe ihrer Sequenz und ihrer Verwendung in dieser Arbeit gegeben. Die Oligodesoxynukleotide tragen teilweise Modifikationen in ihren Basen, z. B. eine Methylierung oder eine Biotinylierung. Bei der Angabe der folgenden Sequenzen steht *M* für 5-Methylcytosin, \ddot{A} für ein 5'-ständiges Adenin, dessen Nukleosid am 5'-Ende einen Biotinrest als Modifikation trägt, und \ddot{C} für ein 5'-ständiges Cytosin, dessen Nukleosid am 5'-Ende einen Biotinrest als Modifikation trägt.

Die angegebenen Oligodesoxynukleotide stammen von der Firma Interactiva-Biotechnologie GmbH, Ulm, oder von MWG-Biotech GmbH, Ebersberg.

1.6.2.a. Verwendete *primer* für DNA-Generierung durch PCR

Für die Herstellung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden nachstehend aufgelistete Oligodesoxynukleotide verwendet. Die Oligodesoxynukleotide sind zumindest in einem Teil ihrer Sequenz komplementär zu der Sequenz einer DNA, die als Vorlage (*template*) für eine Amplifikation der gewünschten DNA durch die PCR dient. Bei der PCR bindet ein Oligodesoxynukleotid an einen Strang der durch Temperaturerhöhung separierten DNA-Stränge des *templates*, ein zweites Oligodesoxynukleotid an eine Sequenz des Gegenstranges. Die für die PCR-Reaktion verwendete DNA-Polymerase kann solche DNA-Sequenzen, die einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt an einem sonst einzelsträngig vorliegenden *template* besitzen, als Basis für eine Verlängerung der kurzen gebundenen Sequenz in Richtung deren 3'-Endes verwenden. Dieses die doppelsträngige Start-Sequenz bildende Oligodesoxynukleotid bezeichnet man als *primer*. So entsteht mit Hilfe eines *primers* aus einem einzelsträngigen *template*-Strang ein DNA-Doppelstrang. Können die beiden *primer* so an die *template*-Sequenz binden, dass sie in Richtung der Bindungsstelle des jeweils anderen *primers* verlängert werden, kann durch zyklische Trennung der *template*-Doppelstränge, Bindung der *primer* an die *template*-Einzelstränge und Vervollständigung der einzelsträngigen *template*-Bereiche 3' zu den *primern* zu Doppelsträngen durch die DNA-Polymerase, der durch die *primer* eingegrenzte DNA-Abschnitt mit exponentieller Wachstumsrate vervielfältigt werden.

Die nachfolgend aufgeführten *primer* dienen der Amplifikation von Sequenzen, die bestimmten Abschnitten der als *template* verwendeten Plasmide entweder entsprechen oder durch Basenaustausche oder Methylierungen mit Hilfe der *primer* modifiziert werden.

Zusätzlich zur Bezeichnung und der Sequenz der *primer* ist angegeben, welche der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide jeweils als *template* für die PCR eingesetzt werden können. Bei einem für eine PCR verwendeten *primer*-Paar unterscheidet man zwischen Hin- (*forward*-) und Rück- (*reverse*-) *primer*. Dabei entsprechen die *forward-primer* in ihrer Sequenz (zumindest teilweise) dem angegebenen Abschnitt der im Anhang gezeigten Sequenz des *template*-Plasmides, die *reverse-primer* der zum angegebenen Abschnitt komplementären Sequenz. Da die Sequenz der Plasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 nicht im Anhang angegeben ist, sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass beide Plasmide in ihrer Sequenz mit der im Anhang aufgeführten Sequenz von pMcrSb1 übereinstimmen,

jedoch zusätzlich zu dieser Sequenz in der einzigen dort vorhandenen *EcoRI* Schnittstelle (5'-G↓AATTC-3', bei Pos. 1) die Sequenz des 61 bp langen Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 besitzen, dessen Enden einer durch das Restriktionsenzym *EcoRI* erzeugten Schnittstelle entsprechen (s. S. 134). Die Orientierung des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 ist in pMcrSb2 und pMcrSb3 unterschiedlich (vgl. S. 184). Entsprechendes gilt für das ebenfalls im Anhang nicht aufgeführte Plasmid pBW201W, das in seiner Sequenz dem Vektor pBW201 mit einer Insertion des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 in der einzigen vorhandenen *EcoRI*-Schnittstelle entspricht. Die für das Plasmid pBR322 (4361 bp) angegebenen Bereiche beziehen sich auf die Nummerierung der pBR322-Sequenz nach Sutcliffe (1979) und Watson (1988), wie sie als Eintrag in die NCBI *GenBank* Datenbank (*Taxonomy ID*: 47470) zu finden ist (die Mitte der Erkennungssequenz von *EcoRI*, 5'-GAATTC, ist bei dieser Nummerierung zwischen Pos. 4361 und Pos. 1).

201-1r, 24 nt

5' -AATAGGAATT CCGCGCACAT TTCC-3'

pBW201: *reverse-primer*, Pos. 516 - 539

pBW201W: *reverse-primer*, Pos. 577 - 600

pMcrSb1: *reverse-primer*, Pos. 792 - 815

pMcrSb2: *reverse-primer*, Pos. 853 - 876

pMcrSb3: *reverse-primer*, Pos. 853 - 876

201-2hb, 20 nt

Modifikation: 5'-Biotin an Cytidin (Ç)

5' -ÇCTGAAAATC TCGATAACTC-3'

pBW201: *forward-primer*, Pos. 236 - 255

pBW201W: *forward-primer*, Pos. 297 - 316

201-2r, 20 nt

5' -AATAAATAAA TCCTGGTGTC-3'

pBW201: *reverse-primer*, Pos. 369 - 388

pBW201W: *reverse-primer*, Pos. 430 - 449

201h-AMspG, 43 nt

5´-CCTGAAAATC TCGATAACTC AAAAAATACG ACCGGGAGTG ATC-3´

pBW201: *forward-primer*, Pos. 236 - 278

pBW201W: *forward-primer*, Pos. 297 - 339

201h-MspG, 43 nt

5´-CCTGAAAATC TCGATAACTC AAAAAATACG CCCGGGAGTG ATC-3´

pBW201: *forward-primer*, Pos. 236 - 278

pBW201W: *forward-primer*, Pos. 297 - 339

201r-CMsp, 43 nt

5´-AATAAATAAA TCCTGGTGTC CCTGTTGATC CCGGGAAGCC CTG-3´

pBW201: *reverse-primer*, Pos. 350 - 392

pBW201W: *reverse-primer*, Pos. 411 - 453

201r-CMspT, 43 nt

5´-AATAAATAAA TCCTGGTGTC CCTGTTGATC CCGGTAAGCC CTG-3´

pBW201: *reverse-primer*, Pos. 350 - 392

pBW201W: *reverse-primer*, Pos. 411 - 453

201r-Eco, 43 nt

5´-AATAAATAAA TCCTGGTGTC CCTGTTGATA TCGGGAAGCC CTG-3´

pBW201: *reverse-primer*, Pos. 350 - 392

pBW201W: *reverse-primer*, Pos. 411 - 453

Lisa1m-A, 34 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa1-A.

5´-AGGTTTACCG CAGMTGCCTC GCGCGTTTCG GTGA-3´

pBR322: *forward-primer*, Pos. 2054 - 2087

Lisa1m-B, 34 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa1-B.

5´-GCTGTGACCG TCTCCGGGAG MTGCATGTGT CAGA-3´

pBR322: *reverse-primer*, Pos. 2102 - 2135**Lisa2m-A**, 34 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa2-A.

5´-AGGTTTACCG CAGMCGGCTC GCGCGTTTCG GTGA-3´

pBR322: *forward-primer*, Pos. 2054 - 2087**Lisa2m-B**, 34 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa2-B.

5´-GCTGTGACCG TCTCCGMCGG CTGCATGTGT CAGA-3´

pBR322: *reverse-primer*, Pos. 2102 - 2135**Lisa3m-A**, 30 nt

Modifikationen: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa3-A.

5´-CGCTGATGAG MTTTACCGCA GMTGCCTCGC-3´

pBR322: *forward-primer*, Pos. 2046 - 2075**Lisa3m-B**, 33 nt

Modifikationen: 5-Methylcytosin (M)

Die unmodifizierte Form dieses *primers* (C anstelle M) heißt Lisa3-B.

5´-TACAGACAAG MTGTGACCGT CTCCGGGAGM TGC-3´

pBR322, *reverse-primer*, Pos. 2112 - 2144

MC63-1bmh, 128 nt

Modifikationen: 5'-Biotin an Adenosin (Ä), 5-Methylcytosin (M)

5' -ÄCCCCATCGA TAAGCTGTCA AACAGATCTG MGC GCAGAGC TTGCATGCCT
GCAGGTCGAC TCTAGAGGAT CCCC GGGTAC CGAGCTCGAA TTTGMGCGCT
CGAGTCTACG CCGGACGCAT CGATGGAG-3'

pMC63: *forward-primer*, Pos. 1811 - 3**MC63-1mr**, 128 nt

Modifikationen: 5-Methylcytosin (M)

5' -CTCCATCGAT GCGTCCGGCG TAGACTCGAG MGC GCAAATT CGAGCTCGGT
ACCCGGGGAT CCTCTAGAGT CGACCTGCAG GCATGCAAGC TCTGMGCGCA
GATCTGTTG ACAGCTTATC GATGGGGT-3'

pMC63: *reverse-primer*, Pos. 1811 - 3**MC63-2bh**, 32 nt

Modifikation: 5'-Biotin an Adenosin (Ä)

5' -ÄCCCCATCGA TAAGCTGTCA AACAGATCTG CG

pMC63: *forward-primer*, Pos. 1811 - 1842**MC63-2bmh**, 32 nt

Modifikationen: 5'-Biotin an Adenosin (Ä), 5-Methylcytosin (M)

5' -ÄCCCCATCGA TAAGCTGTCA AACAGATCTG MG-3'

pMC63: *forward-primer*, Pos. 1811 - 1842**MC63-2mr**, 32 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

5' -CTCCATCGAT GCGTCCGGCG TAGACTCGAG MG-3'

pMC63: *reverse-primer*, Pos. 1907 - 3**MC63-2r**, 32 nt

5' -CTCCATCGAT GCGTCCGGCG TAGACTCGAG CG-3'

pMC63: *reverse-primer*, Pos. 1907 - 3

MspI-1, 30 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

5´-CTTTACCGCG MCGGCCTCGC GCGTTTCGGT-3´

pBR322: *forward-primer*, Pos. 2056 - 2085**MspI-Anti1**, 30 nt

Modifikation: 5-Methylcytosin (M)

5´-CCGTCTCCGG MCGGCGCATG TGTCAGAGGT-3´

pBR322: *reverse-primer*, Pos. 2099 - 2128**Sb1Hin**, 20 nt

5´-TCATCACGAT TCCAAACAGC-3´

pBW201: *forward-primer*, Pos. 4756 - 4775pBW201W: *forward-primer*, Pos. 4817 - 4836pMcrSb1: *forward-primer*, Pos. 5032 - 5051pMcrSb2: *forward-primer*, Pos. 5093 - 5112pMcrSb3: *forward-primer*, Pos. 5093 - 5112**Sb1Rück**, 20 nt

5´-ATTGCAGAGC ATCCTAACTC-3´

pMcrSb1: *reverse-primer*, Pos. 56 - 75pMcrSb2: *reverse-primer*, Pos. 117 - 136pMcrSb3: *reverse-primer*, Pos. 117 - 136**1.6.2.b. Synthetisch hergestellte Substrat-DNA**

Synthetisch hergestellte DNA-Einzelstränge werden in dieser Arbeit neben ihrer Verwendung als *primer* für eine DNA-Amplifikation durch PCR zum Teil auch für eine Generierung doppelsträngiger DNA-Moleküle durch Hybridisierung (*annealing*) eingesetzt. Zusätzlich zu den oben bei der Liste der *primer* aufgeführten, 128 nt umfassenden Einzelstränge MC63-1bmh und MC63-1mr, die zueinander komplementär sind, werden nachstehende, ebenfalls zueinander komplementäre, synthetische Einzelstränge zur Herstellung von DNA-Substrat für das McrBC-Restriktionssystem eingesetzt.

Sb61Hin, 61 nt

Modifikationen: 5-Methylcytosin (M)

5´-AATTCTAAGA MCGGTAGCGA GCTCGTATGA TATCATATTA ATCGGTAAGA
MCGGTAGCGA G-3´

Sb61Rück, 61 nt

Modifikationen: 5-Methylcytosin (M)

5´-AATTCTCGCT AMCGGTCTTAC CGATTAATA TGATATCATA CGAGCTCGCT
AMCGGTCTTA G-3´

1.6.3. Größenstandards für DNA-Gele

Für die Bestimmung der relativen Größe von gelelektrophoretisch analysierten DNA-Fragmenten und Plasmiden (vgl. S. 76) werden nachstehende Größenmarker als Vergleichsfragmente (Größenstandards) verwendet.

10-bp-DNA-Leiter, Fa. Life Technologies (Gibco-BRL, Eggenstein):

33 DNA-Fragmente von 10 bis 330 bp in Größenunterschieden zu je 10 bp

100 bp DNA-Leiter, Fa. Life Technologies (Gibco-BRL, Eggenstein):

15 DNA-Fragmente von 100 bis 1500 bp in Größenunterschieden zu je 100 bp sowie ein 2072 bp großes DNA-Fragment.

100-bp-DNA-Leiter, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot:

1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 & 80 bp.

1-kbp-DNA-Leiter, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot:

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500 & 250 bp.

λ -DNA x *EcoRV*, eigene Präparation:

Der vollständige Verdau linearer DNA des Bakteriophagen λ mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* liefert folgende Fragmentgrößen: 5765, 5376, 4613, 4597, 3873, 3744, 3595, 2884, 2677, 1921, 1679, 1434, 1403, 1377, 738, 655, 649, 618, 588, 268, 35 & 13 bp.

λ -DNA x *HindIII*, institutseigene Präparation:

23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 & 125 bp.

pTR54 x *HinfI*, institutseigene Präparation:

1061, 769, 719, 517, 396, 338, 298, 255, 221, 220, 191, 154, 145 & 75 bp.

1.7. Enzyme, BSA, Marker- und sonstige Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine des McrBC-Restriktionssystems sowie Varianten davon, entstammen eigenen Aufreinigungen (vgl. Kapitel *Proteinpräparation aus Bakterien*, S. 68, und Kapitel *Proteinaufreinigungen*, S. 114) bzw. sind Präparationen, die von U. Pieper (Gießen) durchgeführt wurden.

Aus ebenfalls institutsinternen Aufreinigungen stammen die Enzympräparate der Restriktionsendonuklease *EcoRV* und deren Variante *EcoRV-D90A* sowie der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Sowohl die *EcoRV*-Proteine als auch die *Taq*-DNA-Polymerase sind His₆-Fusionsproteine und wurden mit Hilfe von Ni²⁺-NTA-Affinitäts-Chromatografie aus transformierten Zellen von *Escherichia coli* LK111(λ) aufgereinigt.

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, DNA-Methyltransferasen, Ligasen, Kinasen, Phosphatasen, RNasen und Lysozym sind kommerziell erhältliche Produkte der Firmen AGS (Heidelberg), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics (Mannheim), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), und Stratagene (Amsterdam, Holland).

Als Größenmarker für Proteinanalysen mit Hilfe der denaturierenden SAD-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird die 10-kDa-Proteinleiter von Life Technologies (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet. Sie enthält Proteine der Größen 10 bis 120 kDa in Größenunterschieden zu je 10 kDa sowie ein 200 kDa großes Protein.

Als "unspezifisches Protein", u. a. auch zur Stabilisierung von Enzymen in Lösung, wird Rinderserum-Albumin (BSA) der Firma New England Biolabs (Schwalbach) verwendet. BSA als Standard für Bestimmungen von Proteinkonzentrationen in Lösungen nach Bradford (1976) stammt von der Firma Sigma (St. Louis, USA).

1.8. Radioaktive Nuklide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten einzelsträngigen Oligodesoxynukleotide wurden teilweise vor ihrem Einsatz als *primer* oder Hybridisierungspartner für die Generierung doppelsträngiger DNA an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert. Hierfür wurde [γ -³²P]ATP der Firma DuPont NEN Life Science (Zaventem, Belgien) verwendet. Die ATP-Stammlösung hat am Kalibrierungsdatum eine Konzentration an [γ -³²P] von ca. 1.7 μ M, das entspricht einer radiologischen Aktivität von etwa 18.5 MBq in einem Volumen der Stammlösung von 50 μ l

(^{32}P ist ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 14.3 Tagen). Das autoradiografische Auflösungsvermögen von ^{32}P ist durch die Art der Strahlung auf 5 μm begrenzt.

1.9. Puffer

In dieser Arbeit häufig verwendete Puffersysteme sind nachstehend mit ihrer Zusammensetzung aufgeführt (zur Bedeutung der Abkürzungen in den Puffernamen vgl. S. XIV).

AAP: 250 mM EDTA; 25 % (w/v) Saccharose; 1.2 % (w/v) SDS; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau; 0.1 % (w/v) Xylencyanol FF; pH 8.0 (mit NaOH einstellen)

HED: 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTT oder DTE; 1 mM EDTA

HMD: 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTT oder DTE; 10 mM MgCl_2

LAP: 160 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 40 % (v/v) Glycerin; 0.01 % (w/v) Bromphenolblau

STE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA

TPE: 80 mM Tris-Phosphat, pH 8.0; 2 mM EDTA

Mögliche und zum Teil notwendige Abweichungen von den genannten Konzentrationen und pH-Werten sind an den entsprechenden Stellen vermerkt. Für Katalysereaktionen mit kommerziell erworbenen Enzymen werden, wenn nicht anders angegeben, die entsprechenden Puffer des jeweiligen Herstellers verwendet. Die Zusammensetzung anderer in dieser Arbeit verwendeter Puffersysteme ist an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

2. Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen. Sämtliche verwendeten Gefäße, Medien, Lösungen, Pipetten und sonstiges Material werden zuvor für mindestens 30 min bei 121 °C und 2.5 bar in einem Autoklaven Tecnomara der Firma Integra Biosciences (Fernwald) autoklaviert oder es werden Lösungen aus sterilen Komponenten hergestellt. Zur Durchführung der mikrobiologischen Arbeiten werden FASTER Bio 48 Sterilbänke der Firma Kendro (Hanau) benutzt.

2.1. Bakterienkulturen

In dieser Arbeit werden Bakterien zu verschiedenen Zwecken verwendet. Zum einen dienen sie als System zur getrennten *in-vivo*-Expression der Proteine McrB und McrC, zum anderen zur Vermehrung von DNA, wie zum Beispiel Plasmiden, die als Material für gentechnische Arbeiten dienen sollen, oder generierte Substratplasmide für enzymatische Spaltungstests, die so zugleich *in vivo* durch klonierte Methyltransferasen methyliert werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme enthalten in den verwendeten Plasmiden keine temperaturabhängig-induzierbaren Promotoren, so dass die Anzucht sämtlicher Kulturen, sofern nicht anders angegeben, bei der für *E. coli* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C geschieht.

Das gezielte Übertragen von Bakterien in ein steriles Nährmedium wird als Animpfen bezeichnet. Als Quelle hierfür können Agar-Festkulturen (Erhaltungsplatten oder Transformations-Ausstriche), Glycerinkulturen oder Flüssigkulturen, sog. Vorkulturen, dienen. Das Animpfen einer Kultur aus Fest- oder Glycerinkulturen erfolgt mittels eines zuvor autoklavierten Zahnstochers, mit dessen Spitze man zunächst in den gewünschten Bakterienklon sticht und anschließend im Flüssigmedium abstreicht bzw. vorsichtig auf dem Agar-Festmedium ausstreicht, ohne dessen Oberfläche zu zerstören. Diese Arbeiten finden unter Verwendung einer Sterilbank zum Schutz vor Kontaminationen statt.

Das Wachstum der Bakterien wird durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) der Kulturlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm kontrolliert. Als Referenzwert dient dabei die optische Dichte ($OD^{600\text{ nm}}$) des reinen Nährmediums. Bei einer $OD^{600\text{ nm}}$ von 1 beträgt die Dichte der Bakterien in der Kultur etwa $8 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$. Aus technischen Gründen müssen Lösungen mit einer hohen optischen Dichte ($OD^{600\text{ nm}} > 1$) für eine exakte Dichtebestimmung mit reinem Medium verdünnt werden.

2.1.1. Flüssigkulturen

Bei Flüssigmedien wird zwischen Vor- und Hauptkultur unterschieden. Eine Vorkultur ist ein Flüssigmedium mit einem Volumen von 3 oder 25 ml, das mit einem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt wird. Nach dem Animpfen mit dem gewünschten Bakterienklon wird die Kultur bei 37 °C über Nacht im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend ganz oder teilweise (1 bis 5 ml) in die Hauptkultur überführt. Durch Vorkultivierung kann bei Bakterien, die längere Zeit auf Erhaltungsplatten bei 4 °C oder als

Glyzerinkultur bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, ein verbessertes Wachstum in der (Haupt-)Kultur erzielt werden.

Das Volumen der Flüssigkultur (Hauptkultur) wird durch den Zweck der bakteriellen Kultivierung bestimmt und kann zwischen 3 ml und 500 ml betragen. In dieser Arbeit werden Flüssigkulturen zur Vermehrung von Plasmiden sowie zur Expression von Proteinen benutzt.

2.1.1.a. Flüssigkulturen für Plasmidisolierung

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien, der sog. Plasmidpräparation, wird das Flüssigmedium mit dem gewünschten Bakterienklon und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und bis zum Erreichen der stationären Phase des bakteriellen Wachstums, in der Regel nach über-Nacht-Kultur, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Abschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min bei 4200 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Verwendung des Schwenkbecher-Rotors JS-4.2 der Zentrifuge J6-HC, Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA) pelletiert und der Überstand (das Medium) verworfen. Zur vollständigen Entfernung des Nährmediums kann das Zellpellet schrittweise unter Eiskühlung in 40 ml STE-Puffer resuspendiert und erneut wie zuvor abzentrifugiert werden. Das so gewonnene Bakterienpellet dient als Ausgangsmaterial für die Plasmidpräparation und kann für längere Zeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.1.1.b. Flüssigkulturen für Proteinaufreinigung

Die Proteine McrB und McrC, die Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind, werden *in vivo* durch bakterielle Expressionssysteme erzeugt und anschließend aus den Bakterien isoliert. Die eigens dafür konstruierten Expressionsvektoren (vgl. S. 40) sind Plasmide, die eine durch Zugabe von Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) von außen stimulierbare, starke Transkription der benötigten Gene erlauben. Zur Expression des gewünschten Proteins wird eine 500 ml umfassende Hauptkultur in einem Schikanekolben nach Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (bei den hier verwendeten Konstrukten ausschließlich Ampicillin) mit 5 ml einer Vorkultur angeimpft und, sofern nicht anders angegeben, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelwasserbad inkubiert.

Während der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien, bei einer optischen Dichte von 0.7 bis $1.0\text{ OD}^{600\text{ nm}}$, wird der Kultur 1 mM IPTG zugesetzt und damit die Proteinexpression induziert. Nach einer weiteren Inkubation im Schüttler für mehrere Stunden oder bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}^{600\text{ nm}} > 2$ bei einer Temperatur zwischen RT und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, je nach induziertem Protein, werden die Zellen durch Zentrifugation (15 min

bei 4200 rpm und 4 °C, Verwendung des Schwenkbecher-Rotors JS-4.2 der Beckman Zentrifuge J6-HC) geerntet. Für eine quantitative Entfernung des Nährmediums wird nach Abgießen des Überstandes das Zellpellet schrittweise unter Eiskühlung in 40 ml Puffer resuspendiert und erneut wie zuvor abzentrifugiert. Als Waschpuffer dient der Puffer, der im Rahmen der Proteinaufreinigung als Zellaufschlusspuffer verwendet werden soll. Das auf diese Weise gewonnene Zellpellet ist Ausgangsmaterial für die Aufreinigung des gewünschten Proteins und kann über längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Für eine Überprüfung des Induktionserfolges werden unmittelbar vor der Zugabe des Induktors IPTG sowie unmittelbar vor der Zellernte Aliquots der Bakterienkultur entnommen und gelelektrophoretisch analysiert. Die Volumina der zu entnehmenden Proben sind abhängig von der optischen Dichte der Bakterienlösung und sollten eine vergleichbare Menge an Bakterien enthalten. Bei einer Dichte von $OD^{600\text{ nm}} = 1$ wird 1 ml Kulturvolumen entnommen und in einem Kunststoff-Reaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1.5 ml 2 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge (z. B. Typ 5417C der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, oder Typ MC12V der Firma Du Pont Company (Sorvall), Delaware, USA) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach quantitativer Entfernung des Überstandes wird das Zellpellet mit 50 µl LAP (Laemmli-Gel Auftragspuffer, s. S. 57) für wenige Minuten bei 95 °C denaturiert. Vor dem Auftrag auf ein proteanalytisches Gel (Laemmli-Gel, s. S. 65) werden in der Probe vorhandene Zelltrümmer durch kurze Zentrifugation pelletiert. Aus dem proteinhaltigen Überstand werden 15 bis 20 µl auf das Gel aufgetragen und wie unten beschrieben analysiert.

2.1.2. Lagerung von Bakterien

Flüssigkulturen sind zur Lagerung von Bakterien nicht geeignet, daher werden diese zur vorübergehenden Aufbewahrung auf ein Agar-Festmedium ausgestrichen. Für eine dauerhafte Lagerung empfiehlt sich das Anlegen einer Glycerinkultur des entsprechenden Bakterienklones.

2.1.2.a. Agarplatten

Agarplatten sind sterile Petrischalen, die ein ggf. mit Antibiotikum versetztes Agar-Festnährmedium (s. S. 38) für Bakterien enthalten. Vor dem Ausstrich einer Bakterienlösung auf das Festmedium einer kühl gelagerten Agarplatte muss dieses auf Raumtemperatur erwärmt werden, da sonst die auszuplattierenden Bakterien auf dem sich bildenden Kondenswasser schwimmen und keine Klone bilden können.

Werden mit Bakterienklonen bewachsene Agar-Festmedien als Erhaltungsplatten bei 4 °C gelagert, wird zuvor der Deckel der Petrischale mit Parafilm abgedichtet. Die Lagerung der Platten geschieht mit dem Deckel nach unten, d. h. die Petrischalen liegen über Kopf, so dass die Bakterienklone am Agarboden hängen. Hierdurch wird verhindert, dass im Laufe der Lagerungszeit bildendes Kondenswasser auf die Klone tropft und diese gegebenenfalls vermischt. Auf diese Weise lassen sich die Bakterienklone auf den versiegelte Erhaltungsplatten bis zu vier Wochen lagern. Um Plasmidverluste oder gar ein Absterben der Bakterienkultur zu vermeiden, müssen die Bakterien regelmäßig auf neue Platten ausgestrichen werden. Über Jahre stabil hingegen sind Glycerinkulturen, die bei -70 °C gelagert werden.

2.1.2.b. Glycerinkulturen

Bei der Lagerung von Bakterienkolonien auf Agarplatten (Erhaltungsplatten) über einen längeren Zeitraum besteht die Gefahr, dass sich genetische Abweichungen ausbilden können, die sich z. T. in den nach mehrfachem Umstreichen erhaltenen Kulturen etablieren. Um die genetische Identität der verwendeten Stämme über längere Zeiträume sicherzustellen, werden Glycerinkulturen angelegt.

Hierzu wird eine 3-ml-LB-Vorkultur mit entsprechendem Antibiotikazusatz mittels eines sterilen Zahnstochers mit dem gewünschten Klon von der Erhaltungsplatte angeimpft und über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur (für die verwendeten *E. coli* Stämme 37 °C) im Schüttler inkubiert. Einige weitere 3-ml-Flüssigkulturen (Anzahl nach Bedarf) werden nach entsprechendem Antibiotikazusatz mit 100 µl aus der Vorkultur versetzt und bei 37 °C im Schüttler bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien angezogen. Die dieser Phase entsprechende optische Dichte von $OD^{600\text{ nm}} \approx 0.2$ bis 0.3 wird nach etwa 4 bis 5 Stunden erreicht. Aus jeder Kultur werden 800 µl in einem geeignetem Gefäß mit 20 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt. Das Gemisch wird 20 min auf Eis inkubiert und bei -70 °C gelagert.

Aus solchen Kulturen, die mindestens 1 bis 2 Jahre haltbar sind, können jederzeit mittels eines sterilen Zahnstochers kleine Eisstückchen entnommen werden, die dann zum Ausstreichen auf Agarplatten oder zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden können.

2.1.2.c. Zellpellets

Wird ein späteres Wachstum der Bakterien nicht mehr benötigt, können in Flüssigmedien herangezogene Bakterienkulturen durch Zentrifugation (15 min bei 4200 rpm und 4 °C, Verwendung des Schwenkbecher-Rotors JS-4.2 der Beckman Zentrifuge J6-HC) pelletiert werden. Nach Entfernung des Überstandes können die Zellen durch Resuspendierung in einem Waschpuffer von Medium-Bestandteilen befreit werden. Die Art des zu verwendenden Waschpuffers richtet sich nach dem weiteren, für die Bakterien vorgesehenen Schicksal, das Volumen nach der Größe der zuvor zentrifugierten Kultur. Ein universeller Waschpuffer ist der STE-Puffer (vgl. S. 57), der für ein Ausgangsvolumen von 500 ml Kulturmedium in einem Volumen von 40 ml eingesetzt wird. Nach wiederholter Zentrifugation wie zuvor und erneutem Entfernen des Überstandes kann das auf diese Weise gewaschene Zellpellet für lange Zeit bei -20 °C gelagert werden. Das erneute Animpfen einer Flüssigkultur aus einem so behandelten Zellpellet ist in der Regel nicht erfolgreich, jedoch können aus den Zellen des Pellets beispielsweise Proteine oder Plasmid-DNA isoliert werden.

2.2. Herstellung kompetenter Zellen

Bei molekularbiologischen Arbeiten muss für eine Reihe von Zwecken DNA, in der Regel in Form von Plasmiden, in Bakterienzellen eingeschleust werden. Unbehandelte *E.-coli*-Zellen nehmen externe, freie Nukleinsäuren mit einer für Laborarbeiten wesentlich zu geringen Effizienz durch die Zellwand hindurch auf. Durch geeignete (Vor-)Behandlung der Zellen können diese jedoch für die Aufnahme externer DNA durch entsprechende Transformations-Verfahren kompetent gemacht werden. Je nach Art der Behandlung werden elektrokompente Zellen erzeugt, in die DNA mit Hilfe eines Stromstoßes eingeschleust werden kann, oder kalziumkompetente Zellen, in die DNA durch kombinierte Behandlung mit CaCl_2 bei 0 °C und anschließendem Hitzeschock eingeschleust wird. Beide Methoden erzielen hohe Transformationseffizienzen.

2.2.1. Elektrokompente Zellen

In dieser Arbeit wurden Plasmide zum Teil mittels Elektrotransformation (vgl. S. 98) in die *E.-coli*-Stämme eingeschleust. Dieses Verfahren ist schnell und liefert hohe Ausbeuten. Voraussetzung für diese Art der Transformation sind Bakterienzellen in einer Lösung mit geringer Leitfähigkeit, die wie folgt gewonnen werden. Die Vorschrift ist auf 1 Liter Kulturvolumen ausgelegt und liefert ca. 40 Aliquots elektrokompenter Zellen. Wichtig ist,

dass die Zellen schonend behandelt werden, d.h. nur mit relativ geringer Umdrehungszahl zentrifugiert und immer auf Eis gekühlt werden. Es muss mit eisgekühltem, sterilem Material und unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden.

50-ml-LB-Flüssigmedien mit entsprechendem Antibiotikazusatz werden mittels eines sterilen Zahnstochers mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur (für die verwendeten *E.-coli*-Stämme 37 °C) im Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wird komplett zum Animpfen von einem Liter Flüssigkultur, verteilt auf 2 Schikanekolben mit je 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz, verwendet. Diese Hauptkultur wächst bei 37 °C im Schüttler so lange, bis eine optische Dichte von etwa 0.5 (bis 1) OD^{600 nm} erreicht ist, und wird dann in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt. Ein oftmals empfohlenes halbstündiges Stehenlassen der Kultur vor dem Abzentrifugieren im gekühlten Zentrifugenbecher hat sich als unnötig erwiesen. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 4000 rpm (Verwendung des Schwenkbecher-Rotors JS-4.2 der Beckman Zentrifuge J6-HC) 15 min lang bei 0 °C pelletiert. Der Überstand wird durch Absaugen mit einer Pipette entfernt. Es folgen zwei bis drei Waschschriffe mit jeweils 500 ml eiskaltem Reinstwasser, wobei das Pellet schrittweise mittels einer großen Glaspipette (Fassungsvermögen 25 ml) resuspendiert wird. Beim Entfernen des Überstandes ist darauf zu achten, dass das Pellet nach dem ersten Waschschriff bereits sehr locker sitzt. Die Zentrifugationen werden wie im ersten Schriff durchgeführt. Nach dem letzten Waschschriff wird das Pellet schrittweise in 40 ml einer 10%igen (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in einen Falcon-Becher überführt und wie zuvor zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes werden die Zellen in 2 ml Glycerinlösung resuspendiert (ggf. unter Verwendung eines Vortex-Vibrationsgerätes; Fa. Jancke & Kunkel, Staufen i. Br.) und in Aliquots zu je 80 µl durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der so behandelten Zellen geschieht bei -70°C.

Die auf diese Weise gewonnenen elektrokompetenten Zellen werden erst unmittelbar vor der Elektrotransformation (s. S. 98) langsam auf Eis aufgetaut.

2.2.2. Kalziumkompetente Zellen

Durch eine spezielle Behandlung können Bakterien in Anwesenheit von CaCl₂ nach Eiskühlung bei sprunghafter Temperaturerhöhung um ca. 40 °C ("Hitzeschock") Fremd-DNA mit hoher Effizienz aufnehmen. Nach der diesem Transformationsschriff vorausgehenden Behandlung besitzen die Zellen eine sog. "Kalziumkompetenz". Die Beobachtung, dass

Kalziumionen die Effizienz der Inkorporation von Fremd-DNA in Bakterienzellen stark erhöhen kann, machten zuerst Mandel & Higa (1970) mit Bakteriophagen-DNA. Deren Methode wurde von Hanahan (1983; 1985) verbessert und wird in der hier vorliegenden Arbeit in leicht modifizierter Form angewandt.

Zur Herstellung kalziumkompetenter Zellen wird eine Vorkultur des gewünschten Bakterienklones in 20 ml SOB-Medium (ggf. Zusatz von Selektions-Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C herangezogen und zum Animpfen von 500 ml SOB-Medium verwendet. Diese Hauptkultur wird im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert und bei Erreichen einer Zelldichte von $OD^{600\text{ nm}} \simeq 1$ in einem Eisbad innerhalb von 10 bis 15 min auf 0 °C abgekühlt. Ab diesem Punkt erfolgen alle weiteren Schritte bei 0 bis 4 °C, wichtig ist des Weiteren das absolute Fernhalten von fremdkeimen von der Kultur bzw. den Zellen. Durch Zentrifugation (15 min bei 4200 rpm und 0 °C, Verwendung des Schwenkbecher-Rotors JS-4.2 der Beckman Zentrifuge J6-HC) werden die Zellen pelletiert und anschließend nach Entfernung des Überstandes in 175 ml autoklaviertem TFB-Puffer ($7.4\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, $8.9\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{ H}_2\text{O}$, $1.5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 4\text{ H}_2\text{O}$, $0.8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, 10 mM MES [Kalium-Salz], pH 6.3) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wird das vom Überstand befreite Zellpellet in 25 ml TFB-Puffer aufgenommen und mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt. Zu dieser Lösung werden nun vorsichtig 600 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. SIGMA, Deisenhofen) gemischt, nach 5 min Inkubation auf Eis werden weitere 600 µl DMSO hinzugegeben. Nach zusätzlicher zehnminütiger Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension in Aliquots zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

So vorbereitete Zellen erreichen bei Transformationen mit der Kalzium-Methode (s. S. 99) eine Transformationsrate von ca. 10^5 bis 10^6 Kolonien pro µg superhelikaler Plasmid-DNA. Die Zellen können bei -70 °C etwa 2 Monate lang gelagert werden, danach sinkt die Kompetenz schnell ab.

3. Molekularbiologische Arbeiten

Für alle molekularbiologischen Arbeiten werden sterile (evtl. autoklavierte) Lösungen, Materialien und Gefäße verwendet. Das Pipettieren kleiner Flüssigkeitsvolumina geschieht mit Hilfe von Pipetten der Art Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000 oder P5000 der

Firma Gilson (Vertrieb: Fa. Abimed, Langenfeld) unter Verwendung geeigneter Spitzen. Enzymatische Reaktionen werden in kleinen Volumina in 0.4 bis 2 ml fassenden Einmal-Reaktionsgefäßen aus Kunststoff (klassische "Eppendorf Hütchen", Fa. Eppendorf Vertrieb, Köln; im Folgenden kurz Reaktionsgefäße genannt) durchgeführt, die bei Bedarf unter Verwendung von Heizblöcken des Typs Dri-Block DB-3 (Fa. Techne *Inc.*, Princeton, USA) zwischen Raumtemperatur (RT) und 98 °C temperiert werden. Für längere Inkubationszeiten wird für die Temperierung ein Wärmeschrank (Fa. Memmert, Schwabach) oder ein temperierbares Schüttel-Gerät (Mixer 5432, Fa. Eppendorf) verwendet. Das Mischen kleiner Volumina erfolgt mit Hilfe einer Pipette oder unter Verwendung eines *Vortex*-Vibrationsgerätes (Fa. Jancke & Kunkel, Staufen i. Br.). Für Zentrifugationen kleiner Volumina in den genannten Reaktionsgefäßen werden sog. Tischzentrifugen verwendet (Typ MC12V mit Festwinkelrotor F-12/M.18 der Fa. Du Punt/Sorvall, max. Rotordrehzahl 12 000 *rpm*; oder Typ 5417C mit Festwinkelrotor F45-30-11 der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, max. Rotordrehzahl 14 000 *rpm*).

3.1. Proteine

In der vorliegenden Arbeit werden einige Proteine aus bakteriellen Expressionssystemen isoliert. Im Folgenden wird die Vorgehensweise bei der Proteinpräparation und die Dokumentation der Aufreinigung beschrieben.

3.1.1. Analytische Protein-Gele und deren Dokumentation

Zur Proteinanalyse wird eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt, die eine Auftrennung der Polypeptidketten in einer Laufbahn (*lane*) in einer Polyacrylamid-Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht bewirkt. Durch anschließende Anfärbung der Proteine werden diese im Gel sichtbar, wobei Proteine gleicher bzw. ähnlicher Größe in einer Gelbahn als Banden erscheinen.

3.1.1.a. SDS-PAGE

Die Elektrophoreseapparatur enthält ein zwischen zwei Glasplatten gegossenes und vertikal zwischen zwei Pufferkammern eingespanntes, 10·10 cm großes und 1 mm dickes Polyacrylamid-Gel. Dieses Gel ist diskontinuierlich, es besteht aus zwei unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationen. Die höhere Polyacrylamid-Konzentration bewirkt eine

feinporige Gelmatrix, die die eigentliche Größentrennung der aufgetragenen Proteine bewirkt. Dieses Trenngel bildet den unteren Teil des vertikalen Gelsystems und entsteht aus einer Lösung von 17 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19 : 1), 430 mM Tris-HCl (pH 8.8) und 0.1 % (w/v) SDS, in der durch Zugabe von 0.2 % (v/v) TEMED und 0.08 % (w/v) APS und anschließendem guten Durchmischen die Polymerisationsreaktion von Acrylamid und bisacrylamid zu netzartig verknüpften Acrylamid-Polymeren gestartet wird. Die geringere Polyacrylamid-Konzentration des diskontinuierlichen Systems bewirkt ein großporiges Gel, das als Sammelgel bezeichnet wird und den oberen Teil des vertikalen Gelsystems bildet. Es besteht aus einer Lösung von 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19 : 1), 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) und 0.1 % (w/v) SDS. Vor Abschluss der wie zuvor induzierten Polymerisationsreaktion des Acrylamids werden im Bereich der Oberkante des Sammelgels die Proben-Auftragstaschen gebildet, dies geschieht durch Einfügen eines Kamms in die Gellösung zwischen den Glasplatten unmittelbar nach der Zugabe von TEMED und APS. Der "Sammel"-Effekt dieses Gels beruht in einer Konzentrierung von Proteinen gleicher Größe während des Gellaufes aufgrund der Änderung des pH-Werts bei dem Übertritt in das feinmaschigere Trenngel. Hierfür ist eine scharfe Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel notwendig, die durch vorsichtige Überschichtung der noch flüssigen Trenngel-Lösung mit Ethanol während der Polymerisationsreaktion erzielt wird. Der Ethanol wird vor dem Aufsichten der noch flüssigen Sammelgel-Lösung wieder entfernt. Das zweischichtige SDS-haltige Polyacrylamidgel nach U. K. Laemmli wird im Folgenden als Laemmli-Gel bezeichnet.

Das vollständig auspolymerisierte Laemmli-Gel besitzt an der Oberkante, wo sich die Proben-Auftragstaschen befinden, und der gegenüberliegenden Unterkante Kontakt zu Pufferkammern, die mit Elektrodenpuffer (Laufpuffer), bestehend aus 250 mM Tris-Glycin, pH 8.3 und 0.1 % (w/v) SDS, gefüllt werden.

Nach dem Einbringen der zu untersuchenden Proteinlösungen in die zuvor mit Elektrodenpuffer gespülten Taschen der Gelbahnen mit Hilfe einer geeigneten Pipette, im Folgenden als Auftrag der Proben auf das Gel bezeichnet, wird durch das Gel mit Hilfe eines regelbaren Netzgerätes Strom mit einer Stärke von 30 mA geleitet. Dabei wird der Strom so angelegt, dass die denaturierten Proteine, die im elektrischen Feld zu der Anode (der mit dem Pluspol des Spannungsgerätes verbundenen Elektrode) wandern, durch das Gelsystem laufen müssen. Die Elektrophorese (der Gellauf) dauert für die genannte Größe des Gels bei Einhaltung der genannten Stromstärke bei RT etwa eine Stunde.

3.1.1.b. Probenvorbereitung

Vor der Elektrophorese mit einem Gelsystem muss die zu untersuchende Proteinprobe aufbereitet und mit einem Auftragspuffer versetzt werden. Zur Analyse von Proteinen aus Bakterienzellen werden die Zellen vor der Elektrophorese durch Hitzebehandlung lysiert, durch Proteinfällung wird die Konzentration schwach konzentrierter Proteinlösungen erhöht und die Lösung von störenden Salzen oder Harnstoff befreit.

Der Auftragspuffer enthält Glycerin, welches die Dichte der Probe erhöht und somit das Einbringen der Proben in die mit Elektrodenpuffer gefüllten Auftragstaschen des Laemmli-Gels erleichtert. Desweiteren enthält der Auftragspuffer einen Farbstoff (Bromphenolblau), der im elektrischen Feld bei der Elektrophorese mitläuft, so dass eine optische Kontrolle des Fortschritts des Gellaufes möglich ist. Hier wird als Auftragspuffer für Laemmli-Gele ein entsprechend als Laemmli-Gel-Auftragspuffer (LAP) genannter Puffer verwendet (s. S. 57).

Zell-Lysate

Zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Zellen einer Bakterienkultur, z. B. zur Überprüfung des Erfolges einer induzierten Proteinexpression, wird ein aus der Kultur gewonnenes Zellpellet, das aus einer Zellmenge äquivalent zu einer 1-ml-Flüssigkultur mit einer optischen Dichte von $OD^{600\text{ nm}} = 1$ besteht, in einem Reaktionsgefäß in 50 μl LAP resuspendiert und wenige Minuten auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und einige Minuten zur Pelletierung vorhandener Zelltrümmer bei maximal möglicher Rotordrehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Aus dem proteinhaltigem Überstand werden 15 bis 20 μl in eine Probestasche des analytischen Laemmli-Gels aufgetragen.

TCA-Fällung

Die Fällung von Proteinen aus einer Lösung mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) ermöglicht eine Erhöhung der Proteinkonzentration sowie die Entfernung von Beimengungen aus der Lösung, die den analytischen Gellauf stören können, wie beispielsweise Harnstoff oder hohe Salzkonzentrationen. Hierzu wird die Probe in einem Reaktionsgefäß mit 0.1 Vol. 100 % (w/v) TCA vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Proteine zu einem Pellet, das nach der Zentrifugation von dem Überstand vollständig befreit und in LAP (je nach Proteinmenge zwischen 10 und 20 μl) resuspendiert wird. Dabei verfärbt sich der Indikatorfarbstoff des LAPs, Bromphenolblau, durch die Säurerückstände von blau nach gelb. Vor dem Auftrag der Probe auf das Laemmli-Gel wird die Lösung durch vorsichtige Zugabe von 2 M Tris bis zum Farbumschlag nach blau

titriert, 5 min bei 95 °C inkubiert und durch kurze Zentrifugation von groben, den Gellauf störend beeinflussenden Partikeln befreit.

3.1.1.c. Dokumentation von analytischen Protein-Gelen

Ist der Elektrophorese-Lauf des oben beschriebenen Laemmli-Gels (SDS-PAGE) beendet, wird das Gel vorsichtig aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und für wenige Minuten in leicht kochender Färbelösung, bestehend aus 0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250, 42.5 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure, inkubiert. Dabei wird das Gel komplett blau eingefärbt. Mehrmaliges kurzes Aufkochen in 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt die Gelmatrix wieder und läßt die Proteine als blaue Banden in den Laufbahnen sichtbar werden.

Das so gefärbte Laemmli-Gel wird mit Hilfe eines Weißlicht-Leuchttisches und einer Video-Geldokumentationsanlage (Fa. Intas, Göttingen) dokumentiert.

3.1.2. Proteinpräparation aus Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit werden Varianten der Proteine des McrBC-Restriktionssystems (McrB, McrB_s, McrC, sowie Deletionsvarianten von McrB) als Fusionsproteine mit einer Erweiterung in Form von sechs Histidinresten (His₆) oder in Form der Glutathion-S-Transferase (GST) für eine verbesserte Aufreinigung mit Hilfe der Affinitätschromatografie exprimiert. Als Expressionsvektoren dienen die im Kapitel *Plasmide für Proteinexpression* (vgl. S. 40) beschriebenen Plasmide, die nach einer Induktion durch Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) eine starke Produktion des gewünschten Proteins durch die Bakterienzelle bewirken. Die Anzucht entsprechender Bakterienkulturen ist auf Seite 58 ff. beschrieben.

3.1.2.a. Zellaufschluss

Für eine Präparation des gewünschten Proteins aus den Bakterienzellen müssen diese zuvor aufgeschlossen werden. Dies erfolgt durch enzymatische Lyse unterstützte Ultraschall-Behandlung in einem gekühlten Aufschluss-Puffer und anschließende Sedimentierung der bakteriellen Zelltrümmer durch Zentrifugation.

Ausgangsmaterial sind Zellpellets aus 500 ml Flüssigkulturen, die nach ihrer Ernte bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert werden. Das Auftauen dieser tiefgefrorenen Zellen erfolgt langsam auf Eis. Als Aufschluss-Puffer wird für GST-Fusionsproteine HED (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA) unter Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin

verwendet (HED/Gly), für His₆-Fusionsproteine HED/Gly mit Zusatz von 20 mM Imidazol (HED/Gly/Im). Das einzusetzende Puffervolumen beträgt dabei mindestens das dreifache Volumen des Zellpellets; meist werden die Zellen mit soviel Aufschlusspuffer versetzt, dass nach der sorgfältigen, auf Eis erfolgenden Resuspendierung der Bakterienzellen im Puffer aus jedem Gramm Feuchtgewicht der geernteten Zellen 10 ml Suspensionsvolumen entstehen. Da besonders McrB und seine Derivate sehr empfindlich gegenüber höheren Temperaturen sind, ist die Kühlung mit Eis sehr wichtig.

Dem Zellaufschluss durch die Einwirkung von Ultraschall kann eine enzymatische Behandlung mit Lysozym vorausgehen. Dafür werden den resuspendierten Zellen pro Gramm Feuchtgewicht des eingesetzten Bakterienzellen-Pellets 1 mg Lysozym hinzugegeben und 15 min auf Eis unter leichtem Rühren (Verwendung eines Magnetrührers) inkubiert. Die Suspension wird in ihrer Konsistenz durch die Wirkung des Lysozyms sehr schleimig.

Die Ultraschallbehandlung erfolgt mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier 250, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) unter Rühren (Verwendung eines Magnetrührers) auf Eis, wobei die Einwirkung des Ultraschalls (Geräteeinstellungen: *Output control*: 5; *Duty Cycle* 50 %) zur besseren Kühlung der Proteine in mehreren Intervallen (8·30 s) mit Kühlpausen von je 30 s erfolgt. Anschließend werden die Zelltrümmer sedimentiert (60 min Zentrifugation bei 20 000 *rpm* und 4 °C im Festwinkel-Rotor JA-20 der Beckman-Zentrifuge J2-HS). Der Überstand sollte die gewünschten Proteine enthalten (dies wird durch eine Analyse einer entsprechenden Probe aus Überstand und Zellpellet überprüft) und wird sofort auf eine entsprechend vorbereitete (Affinitäts-) Chromatographiesäule aufgetragen.

3.1.2.b. Affinitäts-Chromatografie zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen eignet sich besonders die Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose als Matrix. Glutathion (GSH), ein Tripeptid (γ -Glutamylcysteinylglycin) mit einer Sulfhydrylgruppe, ist das natürliche Substrat der Glutathion-S-Transferase (GST). Dieses Enzym besitzt dementsprechend eine hohe Affinität zu GSH, was für ein spezifisches "Fischen" der GST aus einer Protein-Mischlösung ausgenutzt werden kann. Über diese Eigenschaft wurde schon vor langer Zeit die affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen, die als Modifikation die GSH-Bindungsdomäne der GST besitzen, mit Hilfe von kovalent an eine Matrix gekoppeltem GSH etabliert (Simons & Vander Jagt, 1977; Eaton *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1986; Smith & Johnson, 1988). Nach dem Abwaschen nicht fest an die Matrix gebundener Proteine kann die

GST, und somit auch ein GST-Fusionsprotein, durch Zugabe von freiem GSH durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung zum matrixfixierten GSH wieder gelöst werden.

In dieser Arbeit wird das geschilderte Prinzip bei der Durchführung einer Säulen-Chromatografie mit matrixgebundenem Glutathion zur Aufreinigung von GST-modifizierten Proteinen des McrBC-Restriktionssystems zunutze gemacht. Als Säulenmaterial dient hier Glutathion-Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden). Bei diesem Material sind GSH-Reste an eine Sepharosematrix gekoppelt. Für jedes Gramm Feuchtgewicht des aus einer erfolgreichen, IPTG-induzierten Proteinexpression stammenden Zellpellets einer Flüssigkultur von *E. coli* TC410 werden 0.3 bis 0.4 ml Matrixmaterial Glutathion-Sepharose 4B verwendet. Vor der Verwendung wird die Affinitätsmatrix mit dem zum Zellaufschluss durch Ultraschall-Behandlung verwendeten HED/Gly-Puffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA, 10 % [v/v] Glycerin) äquilibriert, wobei das dafür verwendete Puffervolumen mindestens das 20-fache des Säulenvolumens betragen sollte. Der Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin zu dem bei der Aufreinigung verwendeten Puffer erbrachte bei der Aufreinigung von Restriktionsendonukleasen und EF-Tu gute Erfolge hinsichtlich der Stabilisierung von Löslichkeit und Aktivität des jeweils aufgereinigten Proteins (Hahn, 1991) und wird aus diesem Grunde auch in dieser Arbeit verwendet.

Wegen der geringen Stabilität der hier aufzureinigenden Proteine werden alle Schritte der Aufreinigung in einem Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die Durchflussgeschwindigkeit der Säule sollte bei der Auftragung der Proteinlösung sowie bei den folgenden Wasch- und Elutionsschritten nicht größer als 1 Tropfen pro Sekunde sein. Es ist darauf zu achten, dass das Säulenmaterial stets mit Puffer überdeckt ist, da sonst die Gefahr besteht, dass die Glutathion-Sepharose zusammensackt und die Säule verstopft. Aus allen bei der schrittweisen Durchführung der Säulenchromatografie die Säule verlassenden Fraktionen werden Proben für eine gelelektrophoretische Kontrolle der Aufreinigungsschritte entnommen, gleiches gilt für das Säulenmaterial nach erfolgter Elution des gewünschten Proteins.

Der Auftrag auf die Säulenmatrix besteht aus dem Überstand der Zentrifugation, die nach dem Aufschließen der Bakterienzellen mit Hilfe des Ultraschalls die Zelltrümmer aus der proteinhaltigen Lösung sedimentierte. Wichtig für eine gute Bindung der GST-Domäne des jeweiligen Fusionsproteins an die GSH-Sepharosematrix der Säule ist neben einer geringen Durchflussgeschwindigkeit die vorherige Angleichung von pH-Wert und Ionenstärke der aufzutragenden Lösung an den zur Äquilibrierung verwendeten Puffer. Für eine verbesserte Ausbeute der GST-GSH-Bindung wird der Durchlauf des ersten Auftrages nochmals auf die

Säule gegeben. Dem zweiten Auftrag schließen sich zwei Waschschriffe mit zum Aufschlusspuffer äquivalentem Volumen an Waschpuffern an. Der erste Waschpuffer ist ein HED/Gly-Hochsalzpuffer, der die Zusammensetzung von HED/Gly besitzt, jedoch abweichend davon die zehnfache Konzentration an KCl enthält (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA, 10 % [v/v] Glyzerin), der zweite Waschpuffer entspricht in seiner Zusammensetzung dem Aufschlusspuffer (HED/Gly). Die Elution des an die Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteins erfolgt durch sehr langsame Zugabe von einigen Millilitern HED/Gly-Puffer, der zusätzlich 20 mM reduziertes Glutathion (GSH) enthält. Ein geteiltes Auffangen des Eluates in mehreren Fraktionen zu je ca. 100 bis 500 µl erhöht die Sauberkeit des gewünschten Proteins. Die einzelnen Fraktionen werden gelelektrophoretisch auf das gewünschte Protein oder durch Bradford-Reaktion auf generellen Proteingehalt untersucht. Für den Nachweis von Proteinen mit der Bradford-Reaktion werden 10 µl jeder Fraktion zu 500 µl braunem Bradford-Reagenz, bestehend aus 0.6 M HCl und 0.06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, gegeben und gemischt. Schon nach wenigen Augenblicken kann anhand eines Farbumschlags der Lösung nach blau eine Lösung als proteinhaltig erkannt werden (die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration ist auf S. 74 beschrieben). Nach der Identifikation der Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, werden diese vereinigt und mit Hilfe eines *Centricon*-Konzentrators (*Centriplus*, Fa. Amicon Inc., Beverly, USA) eingeeengt. Diese Konzentratoren sind vom Prinzip her Siebe mit einer so geringen Porenweite, dass Proteine über 10 kDa (*Centricon* 10) bzw. über 30 kDa (*Centricon* 30) nicht, umgebende Flüssigkeit jedoch hindurchtreten kann. Der Flüssigkeitsdurchtritt durch die sehr engporige Membran wird durch Zentrifugation des *Centricons* in einem Festwinkelrotor (60 min bei 4 500 rpm und 4 °C im Rotor JA-20 der Beckman-Zentrifuge J2-HS) ermöglicht. Der *Centricon*-Konzentrator ist so konstruiert, dass bei Verwendung eines Festwinkelrotors zum Einengen der Proteinlösung ein Restvolumen zurückbleiben muss und die Proteine nicht eintrocknen.

3.1.2.c. Affinitäts-Chromatografie zur Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen

Die durch die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren produzierten His₆-Fusionsproteine werden über eine Affinitäts-Chromatografie mit Nickelchelate-Agarose als Affinitätsmatrix nach Hochuli *et al.* (1987) aufgereinigt. Die Imidazolringe der sechs benachbarten Histidinreste besitzen eine hohe Affinität zu Ni²⁺-Ionen, die in der Matrix über 4 ihrer 6 Koordinationsstellen an die Nitrilotriacetat-Reste (NTA) der Chelatagarose gebunden sind. Die 2 verbleibenden freien Koordinationsstellen der Ni²⁺-Ionen können von

den Imidazolringen der His₆-Erweiterung des Fusionsproteins eingenommen werden. Derartig über die Imidazol-NTA-Affinität an die Trägermatrix gebundene Proteine können durch kompetitive Verdrängung mit freiem Imidazol aus der Ni²⁺-Bindung befreit und wieder in Lösung gebracht werden. Dieses Prinzip wird bei der Ni²⁺-NTA-Säulenchromatografie zur Aufreinigung der His₆-Fusionsproteine ausgenutzt.

Als Ausgangsmaterial dient ein auf eine gute Überproduktion des gewünschten His₆-Fusionsproteins geprüftes und gewaschenes Zellpellet aus einer Bakterien-Flüssigkultur sowie eine Chromatografie-Säule, die mit 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (Fa. Qiagen, Hilden) pro Gramm Feuchtgewicht des verwendeten Zellpellets bestückt und mit dem auch für den Zellaufschluss verwendeten Puffer äquilibriert wird. Hier dient entweder HED/Gly/Im-Puffer, bestehend aus 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin sowie 20 mM Imidazol, oder PDL/Gly/Im-Puffer, bestehend aus 30 mM KP_i, pH 7.2; 0.1 mM DTE; 0.01 % (w/v) Lubrol; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin und 20 mM Imidazol, als Puffer für den Zellaufschluss durch Ultraschall (pro Gramm eingesetztes Zellmaterial mindestens 10 ml Puffer) und als Äquilibrierungspuffer der Ni²⁺-NTA-Agarose (mindestens 20 ml Puffer pro Milliliter Säulenvolumen). Nach dem Zellaufschluss wird der von den bakteriellen Zelltrümmern durch Zentrifugation befreite Überstand langsam durch die Chromatografie-Säule geleitet. Wie auch schon für die Affinitäts-Chromatografie der GST-Fusionsproteine mit Glutathion-Sepharose beschrieben, finden alle Aufreinigungsschritte der Proteinisolation im Kühlraum bei 4 °C statt, da insbesondere die McrB-Varianten sehr instabil sind und bei Temperaturen über 4 °C schnell ihre Aktivität verlieren. Der aus der Säule austretende Durchlauf des ersten Auftrages wird ein zweites Mal durch die Säule geleitet, bevor die an der Säulenmatrix lose gebundenen, nicht erwünschten Stoffe (z. B. andere Proteine) durch mehrmaliges Waschen des Säulenmaterials mit HED/Gly/Im-Puffer bzw. PDL/Gly/Im-Puffer (je nach verwendetem Aufschlusspuffer; insgesamt mindestens 4-faches Volumen des zum Zellaufschluss eingesetzten Puffervolumens), bei dem teilweise die Salzkonzentration (KCl bzw. NaCl) bis auf 500 mM erhöht wird, abgetrennt werden. Zur Elution werden pro Milliliter verwendeter Ni²⁺-NTA-Agarose 5 ml Elutionspuffer verwendet, der aus 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin sowie 200 bis 500 mM Imidazol bzw. (bei Verwendung von PDL-Puffern für den Zellaufschluss) aus 30 mM KP_i, pH 7.2; 0.3 mM DTE; 0.01 % (w/v) Lubrol; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin und 250 mM Imidazol besteht. Das Eluat wird langsam aus der Säule tropfend in mehreren Fraktionen aufgefangen, die, wie bei der Durchführung der Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie beschrieben, auf ihren Proteingehalt

untersucht werden. Die Fraktionen, die das gewünschte Fusionsprotein enthalten, werden vereinigt. Eine Aufkonzentrierung der Proteinpräparation ist in der Regel nicht notwendig, da die verwendeten Expressionsvektoren eine ausgesprochen starke His₆-Proteinexpression induzieren und die Aufreinigung sehr erfolgreich mit hoher Ausbeute durchführbar ist. Um ein Einfrieren des Eluates bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C zu verhindern, kann die Lösung gegen einen entsprechenden Puffer mit einem Gehalt von 50 % (v/v) Glycerin dialysiert werden oder bei ausreichender Proteinkonzentration mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt werden. Wie auch für die Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose beschrieben, werden auch bei der Proteinaufreinigung durch Affinitäts-Chromatografie mit Ni²⁺-NTA-Chelatagarose aus allen die Säule verlassenden Volumina Proben zur Dokumentation der Proteinaufreinigung entnommen und gelelektrophoretisch analysiert. Gleiches gilt auch für das Säulenmaterial nach erfolgter Elution.

3.1.2.d. Anionenaustausch-Chromatografie

Die Anionenaustausch-Chromatografie kann eine weitere Möglichkeit bzw. ein guter Ergänzungsschritt der Proteinaufreinigung sein. Das Prinzip dieser Methode beruht in der Ablösung einer zuvor erhaltenen unspezifischen Bindung des gewünschten Stoffes von einer Matrix durch Änderung der Ionenstärke des umgebenden Milieus, wobei sich der gewünschte Stoff (hier ein bestimmtes Protein) bei einer anderen Ionenstärke bzw. bei einer anderen Salzkonzentration von der Chromatografiematrix löst als ein großer Teil der anderen Stoffe (hier andere Proteine, z. B. unspezifische Nukleasen), die in der Ausgangslösung als Verunreinigung vorhanden sind. In dieser Arbeit wird die Anionenaustausch-Chromatografie mit Diethylaminoethyl-Zellulose (DEAE-Zellulose) als Matrix zur Verbesserung der Reinheit der durch Affinitäts-Chromatografie isolierten GST-McrB-Präparation erprobt.

Die hier verwendete Chromatografie-Matrix ist DE52 (Fa. Whatman, Madistone, England), eine mikrogranuläre DEAE-Zellulose, die vorgequollen geliefert wird. Vor Gebrauch wird das Material in einer Durchfluss-Chromatographiesäule mit dem jeweiligen für die Aufarbeitung verwendeten Puffer äquilibriert. Hierfür läßt man langsam das 20-fache Säulenvolumen an Puffer durch das Chromatografiematerial fließen. Nach dem langsamen Durchfluss des Auftragsvolumens, das aus einem Zellaufschluss oder aus einem anderen, vorangegangenen Aufreinigungsschritt stammt, werden die Proteine unter Durchfluss eines Puffers, der die gleiche Zusammensetzung wie der Äquilibrierungspuffer, aber abweichend davon eine kontinuierlich oder stufenförmig ansteigende Salzkonzentration besitzt, von der DEAE-Zellulose eluiert. Durch Auffangen des Eluates in mehreren Fraktionen, die

gelelektrophoretisch auf den Gehalt des gewünschten Proteins (hier GST-McrB) untersucht werden, läßt sich das gewünschte Protein in seiner Menge relativ zu den Kontaminanten anreichern.

3.1.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wird nach Bradford (1976) durchgeführt. Mit dieser Methode können sehr geringe Proteinmengen ($< 1 \mu\text{g}$) exakt nachgewiesen werden, wodurch nicht allzuviel wertvolles Proteinmaterial aus einer Präparation für die Messung eingesetzt werden muss. Das Prinzip dieser Methode nutzt die Verschiebung des Absorptionsmaximums eines Farbstoffes durch Bindung an Proteine, so dass über photometrische Messung und Vergleich mit einem Standard die Proteinkonzentration der Lösung errechnet werden kann. Als Reagenz dient hier 0.06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 in 0.6 M HCl. Der Farbstoff besitzt in dem sauren Milieu bei Abwesenheit von Proteinen eine bräunliche Färbung und ein Absorptionsmaximum von 465 nm. Bei Anwesenheit von Proteinen in der Lösung färbt sich diese mit steigender Proteinkonzentration zunehmend blau, da das Absorptionsmaximum des proteingebundenen Farbstoffs bei 595 nm liegt. Durch photometrische Messung kann die Absorption der Lösung bei 595 nm bestimmt werden, aus der über eine Eichkurve die Proteinkonzentration berechnet werden kann. Die Eichkurve resultiert aus der Bestimmung der parallel zur eigentlichen Messung aufgenommenen Absorptionen von Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentraion einer Proteinaufreinigung werden verschiedene Verdünnungen der Präparation mit Wasser hergestellt, die ein Volumen von jeweils 500 μl besitzen. Parallel dazu werden entsprechende Volumina mit bekannter Proteinkonzentration angesetzt. In dieser Arbeit wird als Standard Albumin aus Rinderserum (BSA) verwendet, das aus einer Stammlösung mit $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ BSA entnommen und in verschiedenen Verdünnungen in die Messung eingesetzt wird. Zu jedem Volumen von 500 μl der zu untersuchenden Proteinlösungen werden 500 μl des Bradford-Reagenzes gegeben. Nach Durchmischen der Lösungen werden diese für 10 bis 15 min bei RT stehen gelassen. Anschließend erfolgt die photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung wird die Standard-Messreihe jedesmal neu aufgenommen, wobei für Probe und Standard gleiche Inkubationszeiten mit dem Bradford-Reagenz eingehalten werden. Die Absorptionswerte der Standard-Lösungen ergeben bei einem Auftrag gegen die eingesetzte Proteinkonzentration eine Gerade, die bei den höheren Konzentrationen leicht

abflacht. Aus den Messwerten wird durch lineare Regression eine Eichgerade erstellt, über die aus den für die Probenverdünnungen gemessenen Absorptionen die Proteinkonzentration der getesteten Präparation errechnet werden kann.

3.1.4. Test auf aktives Protein in einer Präparation

Die Aktivität einer erhaltenen McrB-Präparation (GST- und His₆-Varianten von McrB sowie von McrB_s) läßt sich gut durch Überprüfung des GTP-Bindungsvermögens der aufgereinigten Proteine bestimmen. Bei diesem Test, der auf der Bindungseigenschaft von Proteinen an Nitrozellulosefilter und dem Unvermögen von Nukleotiden (bzw. allgemein DNA), an diese Matrix zu binden, beruht, wird die Bindung von McrB-GTP-Komplexen an die Nitrozellulosefilter durch Verwendung von radioaktiv markiertem GTP nachgewiesen (Pieper *et al.*, 1997). Ein solcher Test ist für McrC jedoch nicht möglich, da McrC keine Interaktion mit GTP eingeht.

Präparationen von Untereinheiten des McrBC-Restriktionssystems, die für eine DNA-Spaltung *in vitro* notwendig sind (hier also die Fusionsproteine GST- bzw. His₆-McrB sowie GST-McrC), werden hinsichtlich ihrer Qualität durch Test ihres DNA-Spaltvermögens in einem McrBC-Komplex überprüft. Hierzu werden in einem Volumen von 10 µl (mit 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 5 mM KCl; 0.1 mM DTE; 10 mM MgCl₂; 1 mM GTP; 1 µg · ml⁻¹ BSA; 1 % [v/v] Glycerin) 350 ng pBW201 (vollständig *in vivo* methyliert durch *M.MspI*, vorlinearisiert mit *EcoRI*) mit 2 µM McrB und 2 µM McrC bei 30 °C inkubiert. Nach 30 min sollte keine Substrat-DNA mehr in Form des Eduktes lin.pBW201 vorhanden sein.

3.2. DNA

Für die Untersuchung der DNA-Spaltungseigenschaften des GTP-abhängigen Restriktionssystems McrBC aus *Escherichia coli* K-12 wird geeignete Substrat-DNA benötigt, zu deren Herstellung eine ganze Reihe molekularbiologischer Vorarbeiten erfolgen muss. Die für die Durchführung dieser Arbeiten notwendige Vorgehensweise, die damit verbundenen Kontroll- und Analyseverfahren sowie die mit der Charakterisierung der DNA-Bindung und DNA-Spaltung verbundenen Experimente zur Untersuchung der Eigenschaften des McrBC-Systems werden im diesem Kapitel beschrieben.

3.2.1. DNA-Gele und deren Dokumentation

Eine einfach durchführbare Methode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA, wie z. B. Plasmiden, Restriktionsfragmenten, einzel- oder doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden oder Ligationsprodukten, ist die Elektrophorese. Hierbei werden verschiedene DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gel-Matrix bewegt, wobei sie sich abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell fortbewegen. Der Größenparameter der DNA wird durch ihre absolute Länge bestimmt, wobei sich kurze Moleküle schneller durch die Gelmatrix bewegen können als lange, sowie durch die relative Ausdehnung der DNA, die mit zunehmendem Ausmaß die Fortbewegung der DNA im Gel behindert. So laufen lineare, offenzirkuläre (relaxierte) und superhelikale (überspiralisierte) Konformationsformen eines Plasmides trotz gleicher Anzahl an Basenpaaren unterschiedlich schnell. Da die DNA durch die im Zucker-Phosphat-Rückgrat vorhandenen Phosphatreste eine negative Nettoladung trägt, bewegen sich die Moleküle zu der mit dem Pluspol der Stromquelle verbundenen Elektrode, also zur Anode.

Das Gel kann aus verschiedenen Matrices bestehen, die abhängig von dem beabsichtigten Zweck der Elektrophorese zum Einsatz kommen. Die Matrix kann aus Agarose oder, wie oben für die Analyse von Proteinen beschrieben, aus Polyacrylamid bestehen. Je nachdem, ob die doppelsträngige DNA als solche bei der Elektrophorese erhalten bleibt, unterscheidet man zwischen der Auftrennung doppelsträngiger DNA durch native Elektrophorese, die für die meisten Analyse- und Aufreinigungsschritte angewendet wird, und denaturierender Elektrophorese, bei der DNA-Einzelstränge nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Allen im Rahmen dieser Arbeit angewandten Elektrophoresen gemeinsam ist der bei der SDS-PAGE von Proteinen (vgl. S. 65) beschriebene Grundaufbau der Elektrophoresekammer, in der das flache Gel an zwei gegenüberliegenden Seiten mit elektrodenenthaltenden Pufferkammern verbunden ist und an der der Kathode zugewandten Seite durch einen Kamm geformte Probenauftrags-Taschen besitzt. Auf diese Weise laufen bei der Elektrophorese die Proben (hier DNA) durch das flache Gel in Richtung der Anode, wobei das Gel entweder liegt (horizontale Gel-Elektrophorese) oder senkrecht in der Elektrophorese-Apparatur angeordnet ist (vertikale Elektrophorese).

3.2.1.a. Agarose-Gele

Die Analyse von Plasmiden und linearen DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 0.3 bis 30 kbp erfolgt durch horizontale Elektrophorese in einer 10 · 10 cm großen, 0.5 bis max.

1 cm dicken Agarose-Gelmatrix. Die hierfür verwendete DNase-freie Gellösung besteht aus 0.5 bis 1.5 % (w/v) Agarose (Ultra-Pure, Fa. Gibco-BRL oder Life-Technologies) in TPE-Puffer, bestehend aus 90 mM Tris-Phosphat (pH 8.0) und 2 mM EDTA. Ein Gel mit einer Agarose-Konzentration von 1 % (w/v) vermag DNA-Moleküle mit einer Größe von etwa 500 bis 8000 bp mit guter Auflösung aufzutrennen. Für größere DNA-Moleküle wird entsprechend weniger konzentrierte Agarose verwendet, um ein grobmaschigeres Netzwerk zu erhalten, für kleinere DNA-Moleküle verwendet man höher konzentrierte Agarose oder, wie unten beschrieben, Polyacrylamid als Matrix. Die nach Aufkochen klare und flüssige Agarose-Lösung wird nach einem unter stetigem Rühren erfolgenden, langsamen Abkühlen mit einer Temperatur von etwa 50 °C in ein Elektrophorese-Tablett gegossen, wonach durch Einstecken eines Probenkamms beim Abkühlen der Lösung und dem damit verbundenen Festwerden der Agarose Auftrags-Taschen in dem Gel geformt werden. Nach dem Abkühlen ist die Agaroselösung gelartig und je nach Konzentration der Agarose mehr oder minder fest. Laufbedingung für die Elektrophorese ist eine konstante Spannung von max. $8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei RT, wobei das Agarose-Gel leicht mit dem Elektrodenpuffer (TPE) überschichtet ist. Nach dem Mischen der auf das Gel aufzutragenden Proben mit jeweils 0.2 Vol. Agarosegel-Auftragspuffer (AAP), bestehend aus 250 mM EDTA, pH 8.0 mit NaOH; 0.2 % (w/v) SDS; 25 % (w/v) Saccharose; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau und 0.1 % (w/v) Xylenxyanol FF, können die DNA-haltigen Proben in die Geltaschen eingetragen werden. Anhand der sich im Auftragspuffer befindlichen Farbstoffe, die bei der Elektrophorese mit der DNA durch das Gel zur Anode wandern, kann der Fortschritt der Elektrophorese kontrolliert werden. (vgl. Kapitel *Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele*, S. 77). Ein Elektrophorese-Lauf für ein Gel der beschriebenen Größe dauert etwa 60 bis 90 min.

3.2.1.b. Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele

Bei der nichtdenaturierenden (nativen) Polyacrylamidgel-(PAA-)Elektrophorese bilden quervernetzte Acrylamid-Polymere die Matrix für eine Auftrennung der DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Die hierfür notwendige Elektrophorese-Apparatur entspricht der der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgele, mit denen Proteine analysiert werden (vgl. S. 65). Im Gegensatz zu diesem diskontinuierlichen Gel-System bestehen die nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gele aus einer homogenen Gelmatrix und enthalten keine denaturierenden Agenzien. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle verwendet man Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 3.5 bis 20 % (w/v), wobei mit höher konzentrierten Gelen kleinere DNA-Moleküle besser aufgetrennt werden. Das Polyacrylamid ist das Produkt einer

Polymerisation von Acrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) zu linearen Polymeren ($\dots-\text{CH}_2-\text{CH}[\text{CO}-\text{NH}_2]-\text{CH}_2-\text{CH}[\text{CO}-\text{NH}_2]-\dots$) und einer Vernetzung von diesen durch N,N'-Methylenbisacrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Durch Variation der absoluten und relativen Konzentration von Acrylamid und bisacrylamid kann man so fein- und grobporige Gele herstellen. Als Initiator der Polymerisation von Acrylamid und bisacrylamid wird der Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS; $[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$) verwendet. Katalysator bei dieser Reaktion ist N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Für eine homogene Polymerisation sollte die Gellösung vor Start der Reaktion entgast werden, damit anschließend bei der Elektrophorese keine im Gel eingeschlossenen Luftblasen die Auftrennung der DNA stören.

Die in dieser Arbeit häufig zur Identifikation von DNA-Molekülen verwendeten 6%igen PAA-Gele bestehen aus 5.8 % (w/v) Acrylamid; 0.2 % (w/v) bisacrylamid; 0.2 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 0.08 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) in TPE-Puffer, der sich aus 90 mM Tris-Phosphat (pH 8.0) und 2 mM EDTA zusammensetzt. Höher- oder niederprozentige PAA-Gele enthalten entsprechend mehr oder weniger Acrylamid und bisacrylamid im Verhältnis 29 : 1. Auch verwendet werden Gele mit einem Verhältnis von Acrylamid zu bisacrylamid von 37.5 : 1. Der Elektrodenpuffer für die PAA-Elektrophorese ist der auch für die Agarosegel-Elektrophorese verwendete TPE-Puffer. Zum Auftrag der DNA-Proben in die Taschen des vertikalen PAA-Gels wird das aufzutragende Volumen mit 0.2 Vol. Agarosegel-Auftragspuffer (AAP), bestehend aus 250 mM EDTA, pH 8.0 mit NaOH; 0.2 % (w/v) SDS; 25 % (w/v) Saccharose; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau und 0.1 % (w/v) Xylenxylanol FF, versetzt. Der Farbstoff Xylenxylanol verhält sich beim Lauf der Elektrophorese in einem 5%igen PAA-Gel wie ein 260 bp langes, in einem 6%igen PAA-Gel wie ein 220 bp langes, und in einem 8%igen PAA-Gel wie ein etwa 160 bp langes DNA-Stück (Sambrook *et al.*, 1989). Bromphenolblau läuft etwas schneller und verhält sich wie eine 65 bp große (in 5 % PAA) bzw. 45 bp große DNA (in 8 % PAA). Dadurch kann der Fortschritt des Elektrophorese-Laufes kontrolliert werden, der bei den hier verwendeten $10 \cdot 10 \text{ cm}^{-1}$ großen Gelen mit einer konstanten Strömstärke von 30 mA durchgeführt wird und etwa 70 min dauert (Angabe für ein Gel mit einer PAA-Konzentration von 6 %).

3.2.1.c. Mobility-shift-Gele

Abweichend von dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Polyacrylamid-Gelsystem zur Identifizierung nativer DNA-Fragmente werden in dieser Arbeit Polyacrylamid-Gele auch für

andere analytische Zwecke eingesetzt. So ist anhand der Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch Verwendung eines *mobility-shift*-Gels eine Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen möglich. Mittels *mobility-shift*-Elektrophorese sind sowohl basensequenzspezifische als auch unspezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen schnell und mit hoher Empfindlichkeit nachweisbar (Garner & Revzin, 1981; Fried & Crothers, 1981; Ausubel *et al.*, 1989).

Für die Durchführung einer *mobility-shift*-Elektrophorese wird ein nichtdenaturierendes Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel, siehe vorheriges Kapitel) in einem Laufpuffer mit niedriger Ionenstärke verwendet. In dieser Arbeit werden $10 \cdot 10 \text{ cm}^{-1}$ große, vertikale Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 6 % (w/v; mit einem Verhältnis von Acrylamid [AA] zu bisacrylamid [BAA] von 37.5 : 1) in TBE-Puffer, bestehend aus 50 mM Tris-Borat (pH 8.3), 50 mM Borsäure und 1.25 mM EDTA, verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel werden die zu untersuchenden Proteine mit der entsprechenden DNA unter definierten Bedingungen inkubiert, so dass sich das Gleichgewicht zwischen freier DNA und freiem Protein einerseits, und DNA-Protein-Komplexen andererseits einstellen kann. Für ein erleichtertes Einbringen des Probenvolumens in die zuvor gründlich gespülten Auftrags-Taschen des Geles wird das Probenvolumen zuvor mit 0.1 Vol. eines Auftragspuffers versetzt, der aus dem jeweiligen für die Einstellung des Bindungs-Gleichgewichtes verwendeten Puffer mit Zusatz von 50 % Glycerin, 0.5 % (v/v) Azorubin und 0.5 % (v/v) Xylencyanol FF besteht. Während des Elektrophorese-Laufes wandern die DNA-Protein-Komplexe im Gel langsamer als die freie DNA. Durch den sog. "Gelkäfig"-Effekt verbleiben dissoziierte DNA-Protein-Komplexe in der Gelmatrix in starker räumlicher Nähe, was sich wie eine sehr hohe Konzentration beider Liganden auswirkt und zu einer Wiederherstellung des DNA-Protein-Komplexes führt. Somit sind die vor dem Start der Elektrophorese gebildeten Gleichgewichts-Komplexe während des mitunter Stunden dauernden Elektrophorese-Laufes rein netto gesehen stabil. Der Elektrophorese-Lauf erfolgt für 15 min bei 150 V bei RT, direkt anschließend für weitere 60 min bei 120 V bei RT oder für mehrere Stunden bei 120 V im Kühlraum bei 4 °C.

Je nach Anzahl und Art der auf der DNA gebundenen Proteine sind nach der Elektrophorese verschieden große Komplexe durch Anfärbung der DNA (und/oder der Proteine) nachweisbar. Bei der *mobility-shift*-Elektrophorese kann zur Verbesserung der Aussagekraft des Experimentes die zu untersuchende DNA radioaktiv markiert werden (vgl. S. 92). Dadurch ist zum einen ein empfindlicher Nachweis selbst geringer Mengen DNA möglich, so dass die Konzentration an DNA im Bindungsansatz sehr niedrig gewählt werden kann, zum anderen können durch Zusatz einer anderen, nicht radioaktiv markierten DNA, die keine für

das zu untersuchende Protein spezifische Basensequenz enthält, unspezifische Wechselwirkungen zwischen der markierten DNA und dem Protein verdrängt werden.

3.2.1.d. Denaturierende Polyacrylamid-Gele

Mit Hilfe von Gel-Elektrophorese können unter Verwendung denaturierender Polyacrylamid-Gele DNA-Einzelstränge bis auf ein Nukleotid genau in ihrer Größe bestimmt und sogar sequenziert werden. Hierzu werden die im experimentellen Ansatz meist doppelsträngigen DNA-Moleküle vor dem Auftrag auf das Gel-System in ihre Einzelstränge geteilt (*denaturiert*). Dies geschieht durch kurzes Aufkochen der DNA-haltigen Probe in EDTA-haltigem Formamid ($\text{NH}_2\text{-CHO}$). Während des Gel-Laufes wird durch einen hohen Gehalt an Harnstoff im PAA-Gel ein Wiederausammenlagern (Rehybridisieren od. Renaturieren) der denaturierten DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang verhindert. Da die Position der DNA-Einzelstränge im denaturierenden Gel nach Beendigung der Elektrophorese schlecht durch Färbemethoden nachweisbar ist, verwendet man für derartige Gel-Systeme DNA, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder durch Einbau radioaktiver Nuklide markiert wurde. Der Vorteil dieser Methode bei der Analyse von DNA-Spaltungsereignissen ist, dass man nicht die ungefähre Größe der bei der DNA-Spaltung entstandenen Fragmente erhält, sondern die genaue Spaltposition in den einzelnen DNA-Strängen ermitteln kann.

Die zu analysierende DNA wird vor dem Auftrag auf das Gel zunächst aus der Probenlösung gefällt (s. Kapitel *DNA-Fällung aus Lösungen*, S. 87), getrocknet, in wenigen Mikrolitern Formamid-EDTA-Lösung (Verhältnis Formamid : EDTA = 5 : 1) aufgenommen, wenige Minuten lang bei 95 °C inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Das bei dieser Art der Elektrophorese verwendete Gel ist ein 43 · 22 cm großes PAA-Gel mit einer Dicke von 0.5 bis 1 mm, das in einer *Base Runner 100* Elektrophorese-Apparatur (IBI, Kodak) vertikal angeordnet ist. Das Gel besteht aus 6 % (w/v) Polyacrylamid (mit AA : BAA = 19 : 1), 500 g · l⁻¹ (entspricht ca. 8.3 M) Harnstoff, 0.04 % (v/v) TEMED und 0.03 % (w/v) APS in TBE-Puffer, bestehend aus 100 mM Tris-Borat (pH 8.3) und 2.5 mM EDTA. Vor dem Start der Polymerisationsreaktion von Acrylamid (AA) und bisacrylamid (BAA) zu Polyacrylamid durch die Zugabe von TEMED und APS in die Gel-Lösung muss diese, sobald der Harnstoff vollständig gelöst wurde (Lösungsvorgang evtl. durch Erwärmung unterstützen), durch Filtration durch einen Nitrozellulose-Membranfilter mit einer Porenweite von 0.2 µm (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) von Verunreinigungen befreit und mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast werden. Die vollständige Polymerisationsreaktion dauert einige Stunden. Für eine qualitativ hochwertige Auftrennung der DNA-Einzelstränge in dem denaturierenden

PAA-Gel wird die notwendige Betriebstemperatur des Gels durch einen halbstündigen Vorlauf des unbestückten Gels mit einer Leistung von 50 W erreicht, so dass das Gel bei Beginn des eigentlichen Separationslaufes eine Temperatur von 50 bis 60 °C besitzt. Vor dem Auftrag der DNA-Proben auf das Gel müssen die Auftragstaschen des Gels durch Spülen mit Elektrophoresepuffer (TBE) von Harnstoff befreit werden. Die Größenauftrennung der DNA-Einzelstränge dauert bei einer Leistung von 50 W ca. 2 Stunden.

3.2.1.e. Dokumentation von DNA-Gelen

Der Nachweis von DNA-Banden in einem Gel nach Beendigung der Elektrophorese erfolgt durch Anfärbung mit Ethidiumbromid. Hierfür werden die Gele durch leichtes, 10- bis 20minütiges Schwenken in einer wässrigen Lösung mit $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid gefärbt. Dabei interkaliert der Farbstoff Ethidiumbromid zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA. Nach 10 bis 20 minütigem Schwenken in Wasser ist das Gel entfärbt, der Farbstoff verbleibt dabei jedoch in der DNA. Die DNA kann so durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 312 nm (UV-Licht) auf einem Transilluminator (Bachhofer, Reutlingen) sichtbar gemacht und das Ergebnis mit Hilfe eines Videosystems (INTAS, Göttingen) dokumentiert werden.

Die oben beschriebenen denaturierenden harnstoffhaltigen Polyacrylamid-Gele enthalten, wie zum Teil auch die *mobility-shift*-Gele, radioaktiv markierte DNA, deren Position nach der Auftrennung in dem jeweiligen Gel mit Hilfe der im Kapitel *Autoradiografie* beschriebenen Methoden dokumentiert wird (vgl. S. 99). Ein Anfärben einzelsträngiger DNA mit Ethidiumbromid geschieht nur mit geringer Effizienz.

3.2.2. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation einer gewünschten DNA-Sequenz (Mullis & Faloona, 1987; Mullis, 1990; Mullis *et al.*, 1994). Das hierbei angewendete Prinzip der Vervielfältigung einer DNA beruht auf einer Hitzedenaturierung der DNA bei 95 °C, wodurch diese einzelsträngig als Vorlage (*template*) für eine enzymatisch unterstützte Amplifikation eingesetzt werden kann. Als enzymatische Katalysatoren für den Verdoppelungsprozess dienen hierbei hitzestabile DNA-Polymerasen (beispielsweise *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*). Die DNA-Polymerasen benötigen für die Vervollständigung eines einzelsträngigen DNA-Abschnittes zu einem DNA-Doppelstrang

einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt, von dem aus sie in 3'-Richtung den fehlenden Strang zu verlängern vermögen. Diese notwendige Startstruktur wird durch Bindung kurzer DNA-Einzelstränge (*primer*, vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49) an die Enden des zu amplifizierenden Abschnittes des einzelsträngigen *templates* erzielt, wobei ausgenutzt wird, dass die kurzen *primer*-Sequenzen durch ihre höhere Konzentration bei höheren Temperaturen an die Einzelstränge hybridisieren können als die langen DNA-Komplementärstränge. Die *primer* können in ihrer Nukleotidsequenz teilweise, insbesondere in ihrem 5'-terminalen Bereich, von der komplementären Sequenz des *template*-Stranges abweichen. Da einige Basenfehlpaarungen sowie 5'-abweichende *primer*-Sequenzen häufig ohne wesentlichen Einfluss auf die Hybridisierung der teilkomplementären *template*/*primer*-Einzelstränge sind, kann mit Hilfe der PCR-Methode über entsprechend abweichende *primer*-Sequenzen eine gezielte Abänderung der Vorlagesequenz in der durch die PCR entstehenden DNA-Kopie erzielt werden. Als Kofaktoren bzw. Kosubstrate für die Reaktion benötigen die DNA-Polymerasen Mg^{2+} -Ionen sowie Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP sowie dTTP), die unter Abspaltung von Pyrophosphate über Knüpfung von Phosphodiesterbindungen in der durch das *template* vorgegebenen Sequenz polymerisiert werden.

Durch zyklische Wiederholung der drei Schritte *Denaturierung* (Teilung der DNA-Doppelstränge des *templates* zu Einzelsträngen durch Hitze), *Hybridisierung* (Bindung der *primer* an die einzelsträngige *template*-DNA) und *Synthese* (Verdoppelung der einzelsträngigen *template*-DNA durch die DNA-Polymerase) wird die gewünschte DNA mit exponentiellem Zuwachs amplifiziert. Die geschieht mit Hilfe eines programmierbaren Thermocyclers (z. B. Varius M, Fa. Landgraf, Hannover, oder Thermocycler 2400, Fa. Applied Biosystems, Norwalk, USA), der die Reaktionsgefäße mit den PCR-Reaktionsansätzen für die gewünschten Zeiten auf die notwendigen Temperaturen erhitzt bzw. abkühlt.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA (im Unterschied zur DNA-Sequenzierung mit Hilfe von PCR, s. Kapitel *DNA-Sequenzierung*, S. 96) setzt sich aus wenigen Nanogramm *template*-DNA (i. d. R. Plasmide, z. T. aber auch Oligodesoxynukleotide), 400 nM *primer* (*forward-primer* und *reverse-primer*, vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49), 200 μ M je dNTP und 0.1 bis 1 *units* DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 μ l zusammen. Als Reaktionspuffer wird der vom Hersteller der DNA-Polymerase mitgelieferte Synthesepuffer verwendet. Für die in dieser Arbeit verwendete *Taq*-DNA-Polymerase aus institutseigener Aufreinigung enthält der Reaktionsansatz folgende Pufferkomponenten: 1.5 mM $MgCl_2$, 1 $mg \cdot ml^{-1}$ BSA, 10 mM Tris-

HCl (pH 9.0 bei 25 °C), 50 mM KCl und 0.1 % Triton X-100. Bei dem hier meist verwendeten Thermocycler Varius M der Firma Landgraf muss der Reaktionsansatz zum Schutz vor Verdunstung mit Paraffin-Öl überschichtet werden.

Das bei der Durchführung der PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA in dieser Arbeit verwendete Temperaturprofil bewirkt eine einmalige, anfängliche DNA-Denaturierung (5 min bei 95 °C), zyklisch wiederholte DNA-Amplifikation (30- bis 35-fache Wiederholung der Abfolge: 1 min *primer-Hybridisierung* bei 54 °C → 1 min *DNA-Synthese* bei 72 °C → 30 s *DNA-Denaturierung* bei 95 °C), eine abschließende Vervollständigung noch einzelsträngig vorliegender *template*-Sequenzen zu DNA-Doppelsträngen ("*Auffüll-Schritt*", 200 s *DNA-Synthese* bei 72 °C nach 1 min *primer-Hybridisierung* bei 54 °C) und eine Lagerung des Reaktionsansatzes nach Beendigung der PCR-Reaktion bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung (sofortige Aufreinigung der amplifizierten DNA oder temporäre Lagerung bei -20 °C). Der Übergang von einem Temperatursegment zum nächsten benötigten erfolgt schnellst möglich (d. h. theoretisch ohne Verzögerung, technisch bedingt jedoch innerhalb weniger Sekunden).

3.2.3. DNA-Hybridisierung

Eine Möglichkeit der Herstellung doppelsträngiger DNA-Moleküle ist die Hybridisierung synthetisch hergestellter DNA-Einzelstränge. Da hierbei das Prinzip der komplementären Basenpaarung ausgenutzt wird, müssen die zu hybridisierenden Einzelstränge zum Großteil zueinander komplementäre Sequenzen besitzen. Für die komplementäre Bindung zweier DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang müssen zuvor die in den Einzelsträngen vorhandenen Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Diese Denaturierung der DNA geschieht durch Erhitzen der DNA-Moleküle.

Die synthetisch hergestellten DNA-Einzelstränge werden bei -20 °C in Stammlösungen zu 100 µM gelagert. Ein Ansatz zur Hybridisierung zweier Einzelstränge enthält in einem wenige Mikroliter umfassenden Volumen beide DNA-Einzelstränge in einer Konzentration von jeweils 20 µM sowie Salz (MgCl₂ oder NaCl) in einer Konzentration von 100 mM. Der Ansatz wird auf 95 °C erhitzt und über einen Zeitraum von mehreren Stunden kontinuierlich abgekühlt. Durch das langsame Abkühlen wird gewährleistet, dass sich die gewünschten komplementären Basenpaarungen in hoher Effizienz korrekt ausbilden. Kurzkettige Oligodesoxynukleotide können auch durch rascheres Abkühlen gut miteinander hybridisiert werden. Nach dem Abkühlen wird der Erfolg der Hybridisierung mit Hilfe eines geeigneten Gelsystems elektrophoretisch analysiert.

3.2.4. Aufreinigung von DNA

Damit DNA in experimentelle Untersuchungen eingesetzt werden kann, muss sie meist ein hohes Maß an Reinheit und Homogenität besitzen. Dies ist notwendig, um definierte Versuchsbedingungen realisieren zu können sowie den Einfluss von Fremdstoffen unbekannter oder unerwünschter Art und Menge auszuschließen, und bedeutet, dass die gewünschten DNA-Moleküle aus vorhandenen Lösungen, wie z. B. dem Ergebnis eines PCR-Ansatzes oder einer enzymatischen Behandlung, oder aus Organismen, beispielsweise aus bakteriellen Expressionssystemen, isoliert werden müssen, um sie von störenden Kontaminaten zu befreien. Die gewünschten DNA-Moleküle werden je nach ihrer Herkunft und ihrem weiteren vorgesehenen Verwendungszweck mit unterschiedlichen Methoden aufgereinigt, die im Folgenden beschrieben werden.

3.2.4.a. Plasmide

Die Isolation von Plasmiden aus bakteriellen Systemen kann je nach der benötigten Menge an Plasmid-DNA auf verschiedene Weise erfolgen. In dieser Arbeit wird für analytische Zwecke Plasmid-DNA aus Bakterien einer 3 bis 5 ml großen Flüssigkultur (vgl. S. 58) isoliert. Diese sog. Plasmid-*Minipräparation* liefert bis zu 5 µg DNA und geschieht unter Verwendung kommerziell erhältlicher Präparationshilfen (*Spin Plasmid Kit*, Fa. Qiagen, Hilden) nach Angabe des Herstellers (die Plasmid-DNA wird in dieser Arbeit mit 70 µl halbkonzentriertem TE-Puffer von der Präparationssäule eluiert) oder durch den Pipettierroboter BIOROBOT 9600 der Fa. Qiagen (Hilden) unter Verwendung des Protokolls QIAPREP TURBO 96 (die Plasmid-DNA wird hier mit 100 µl EB-Puffer der Fa. Qiagen eluiert). Mehr Plasmid-DNA (Größenordnung 100 µg) wird durch eine sog. Plasmid-*Midipräparation* gewonnen, die von einer bakteriellen Flüssigkultur mit einem Volumen von 100 ml ausgeht. Hierfür werden kommerziell erhältliche Präparationshilfen nach Anleitung der Hersteller verwendet (*Nucleobond AX100*, Fa. Macherey-Nagel, Düren; oder *Qiagen tips 100*, Fa. Qiagen, Hilden). Bei diesen Verfahren wird die eluierte DNA abschließend einer isopropanolunterstützten Fällung unterzogen (vgl. Kapitel *DNA-Fällung aus Lösungen*, S. 87) und in 200 µl Wasser aufgenommen.

Etwa 300 µg DNA können durch eine sog. Plasmid-*Maxipräparation* isoliert werden. Dieses Präparationsverfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und geht von einer Bakterienkultur in 500 ml Flüssigmedium aus. Die schrittweise Resuspension des nach dem Waschen der Bakterien erhaltenen Zellpellets (vgl. S. 59) erfolgt in 20 ml

Lösung I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose). Der Ansatz wird nach Zusatz von 100 µl RNaseA (10 mg · ml⁻¹ in 5 mM Tris-HCl, pH 8.0) und 80 µg Lysozym 15 min. bei RT inkubiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt nach Zusatz von 40 ml frisch angesetzter Lösung II (8 ml 1 M NaOH, 28 ml Wasser, 4 ml 10 % SDS), wobei durch gelegentliches Schwenken bei der 10minütigen Inkubation auf Eis die Lösung klar und viskos wird. Nach Zugabe von 30 ml Lösung III (3 M KAc, pH 4.8, 0° C) bildet sich während der 30minütigen Inkubation auf Eis ein schleimig-weißer Niederschlag. Das klare Lysat wird in drei Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (20 min bei 20 000 rpm und 4°C; Festwinkelrotor JA-20, Beckman-Zentrifuge J2-HS). Die erste DNA-Fällung erfolgt nach Filtration des Überstands über einen Faltenfilter in einen 150 ml fassenden Corexbecher durch Zusatz von 55 ml Isopropanol. Die Inkubation des Ansatzes für 20 min bei -20 °C soll eine verbesserte Ausbeute der Fällung ergeben. Nach einer 30minütigen Zentrifugation des Ansatzes bei 5 000 rpm und 4 °C im Festwinkelrotor JA-14 (Beckman-Zentrifuge J2-HS) wird der Überstand verworfen, das erhaltene Pellet getrocknet, anschließend in 8 ml TE gelöst und in einen 15 ml fassenden Corexbecher überführt. Nach Mischen der Lösung mit 2 ml 10 M Natriumacetat erfolgt die Proteinfällung bei 20minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis. Anschließend werden die gefällten Proteine durch Zentrifugation gefällt (15 min bei 7 000 rpm und 4 °C; Verwendung des Schwenkbecherrotors JS-13.1, Beckman-Zentrifuge J2-HS). Die zweite DNA-Fällung erfolgt nach Zusatz von 20 ml eiskaltem, reinem Ethanol zu dem Überstand bei einer 20minütigen Inkubation des Ansatzes auf Eis. Der Fällungsansatz wird wie zuvor abzentrifugiert. Das getrocknete DNA-Pellet wird in 4 ml TE-Puffer aufgenommen. Die abschließende DNA-Fällung erfolgt nach Zusatz von 80 µl 5 M NaCl und 8 ml reinem Ethanol durch eine 20minütige Inkubation des Ansatzes bei -20°C. Anschließend wird die DNA wieder wie zuvor pelletiert. Das Sediment wird mit 4 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl halbkonzentriertem TE-Puffer sorgfältig gelöst.

3.2.4.b. PCR-Produkte

DNA-Lösungen, die als Produkt aus PCR-Ansätzen entstehen, enthalten meist störende Beimischungen, wie z. B. Phosphationen, Salze, freie Nukleosid-Triphosphate und unerwünschte DNA-Sequenzen (*template*-DNA, *primer* und Nebenprodukte der PCR-Reaktion). Für eine saubere Isolation eines bestimmten PCR-Produktes, insbesondere zur Abtrennung störender Nebenprodukte, wird dieses gelelektrophoretisch aufgereinigt (näheres hierzu siehe nachstehendes Kapitel *Präparative Agarose-Gele*). Eine Abtrennung von Salzen und kurzen

DNA-Sequenzen (z. B. *primern*) erfolgt mit Hilfe kommerziell erhältlichen Aufreinigungszubehörs (sog. Präparations-*Kits*).

Eine einfache Aufreinigung von PCR-Produkten geschieht in dieser Arbeit unter Verwendung der Präparationskits *NucleoSpin Extract* (Art.-Nr. 740590, Fa. Macherey-Nagel, Düren), *NucleoTrap* (Fa. Macherey-Nagel) oder *QIAquick PCR Purification Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben der Hersteller. Diese Systeme beruhen auf dem Bindungsvermögen von DNA an eine Ionenaustauscher-Matrix in Anwesenheit von Ethanol und sog. chaotrophen Salzen. Die Matrix ist in einem Durchfluss-Zentrifugenröhrchen befestigt, so dass Bindung der DNA, Abwaschen kleiner Kontaminations-Moleküle (einschließlich kurzer DNA, wie z. B. die meisten *primer*) und Elution der DNA mit Hilfe einer Zentrifuge sehr schnell erfolgen können. Die Elution der DNA von diesen sog. *spin-tubes* erfolgt in dieser Arbeit mit 5 mM Tris-HCl (pH 8.5) oder mit Wasser. Der Erfolg der Aufreinigung wird gelelektrophoretisch analysiert.

3.2.4.c. Präparative Agarose-Gele

Die im Kapitel *DNA-Gele und deren Dokumentation* beschriebenen Agarose-Gele (s. S. 76) können neben ihrer analytischen Verwendung auch für eine Isolierung von bestimmter DNA und deren Aufreinigung eingesetzt werden. Hierzu wird eine die gewünschte DNA enthaltende Probe auf ein Agarose-Gel mit für präparative Zwecke entsprechend breiten Auftragstaschen aufgetragen und in diesem Gel elektrophoretisch von DNA anderer Größe, die sich möglicherweise ebenfalls in der Probe befindet, separiert. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid (s. Kapitel *Dokumentation von DNA-Gelen*, S. 81) läßt sich im UV-Licht durch Vergleich mit einem Größenstandard die gewünschte DNA im Gel identifizieren, die dann in einem entsprechenden Agarose-Block aus dem Gel ausgeschnitten wird.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus den Gelblöcken wird das Präparationskit *NucleoSpin Extract* (Art.-Nr. 740590, Fa. Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der DNA von diesen sog. *spin-tubes* erfolgt in dieser Arbeit mit 5 mM Tris-HCl (pH 8.5) oder mit Wasser. Der Erfolg der Aufreinigung wird gelelektrophoretisch analysiert.

3.2.4.d. Gelfiltration

Hinter dem Begriff Gelfiltration steht eine chromatografische Methode zur Aufreinigung von Molekülen. Die Gelfiltrations-Chromatografie wird in dieser Arbeit für die Entsalzung von DNA-Lösungen eingesetzt, insbesondere zur Aufreinigung von Oligodesoxynukleotiden,

die mit dieser Methode nach einer radioaktiven Endmarkierung (vgl. Kapitel *Radioaktive Markierung von DNA*, S. 92) auch von ungebundenen Nukleosidphosphaten (ADP, ATP) befreit werden können. Als Gelfiltrationsmatrix dient hier das Zuckerpolymer Sephadex[®] G-25 in Chromatographiesäulen (NAP[®]-10) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Das Säulenmaterial wird in dieser Arbeit mit Wasser äquilibriert. Nach dem Auftrag der aufzureinigenden DNA-Lösung wird die Differenz zwischen Fassungsvermögen des Säulenmaterials (1 ml) und dem aufgetragenen Volumen der DNA-Lösung (max. 1 ml) in Form von Wasser auf die Säule gegeben. Die DNA (Oligodesoxynukleotide) wird anschließend mit 1 ml Wasser eluiert.

Um eine Verringerung des Lösungsvolumens zu erhalten, wird das Wasser der Lösung mit Hilfe einer vakuumunterstützten Zentrifugation verdampft. Um ein definiertes Volumen zu erhalten, können Oligodesoxynukleotide mit dieser Methode bis zum Erreichen vollkommener Trockenheit behandelt (dies dauert bei der hier verwendeten *SpeedVac* mehrere Stunden) und anschließend in dem gewünschten Volumen Wasser oder Puffer gelöst werden. Der Lösungsvorgang kann durch Auf- und Abziehen der Lösung in eine Pipette unterstützt werden. Kurze DNA-Moleküle, beispielsweise Oligodesoxynukleotide, können auch für eine Beschleunigung des Lösungsvorganges vorsichtig *gevortext* werden (bei größeren DNA-Molekülen ist davon aufgrund der bei der Benutzung eines *Vortex*-Vibrationsgerätes auftretenden Scherkräfte abzusehen).

3.2.4.e. DNA-Fällung aus Lösungen

Das allgemeine chemische Phänomen, dass Stoffe in Lösungen, z. B. Moleküle oder Ionen, in verschiedenen Lösungsmitteln, bei unterschiedlichen Salzkonzentration sowie bei unterschiedlichen pH-Werten in der Lösung eine unterschiedlich gute Löslichkeit besitzen, kann auch für eine gewünschte Entfernung von DNA aus einer Lösung ausgenutzt werden. Dies kann im Rahmen einer Aufreinigung von bestimmter DNA geschehen oder auch für eine Erhöhung der DNA-Konzentration in der Lösung. Zu diesem Zweck werden zu der wässrigen DNA-Lösung organische Lösungsmittel und monovalente Kationen gegeben, bis die DNA als unlösliches Salz aus der Lösung ausfällt. Dieser Niederschlag kann durch Zentrifugation quantitativ pelletiert und so von der Lösung abgetrennt werden.

Als organische Lösungsmittel für eine DNA-Fällung aus Lösungen eignen sich die Alkohole Ethanol oder Isopropanol, als monovalente Salze beispielsweise Ammoniumacetat, Natriumchlorid oder Natriumacetat. In dieser Arbeit wird für die DNA-Fällung das aus leicht flüchtigen Komponenten bestehende Ammoniumsalz der Essigsäure, Ammoniumacetat,

benutzt. Ammoniumacetat bietet den Vorteil, dass es nicht nur durch Auswaschen überschüssigen Salzes, sondern auch durch Sublimation bei einer sich an die Fällung anschließenden Trocknung der DNA wieder vollständig von der gefällten DNA entfernt werden kann. Die vollständige Entfernung der Salze ist für viele Schritte der DNA-Fällung anschließenden Schritte notwendig, beispielsweise für eine Elektrotransformation von Plasmiden in Bakterien.

DNA wird in dieser Arbeit aus einer 70 %igen Ethanollösung mit 0.1 bis 0.7 M Ammoniumacetat oder durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol gefällt. Die Zugabe von Ammoniumacetat erfolgt aus einer Lösung von 3 bis 10 M Ammoniumacetat (pH 4.8). Ist die Konzentration der zu fällenden DNA sehr gering, kann durch Zugabe einer Fällungshilfe (*inert carrier*, z. B. 0.02 bis 0.2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Glykogen) sowie durch 20minütige Inkubation des Fällungsansatzes bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Effizienz der Fällung verbessert werden. Die Pelletierung der DNA geschieht durch Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bei Raumtemperatur; kleine Fällungsansätze werden in den oben genannten Tischzentrifugen 30 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, größere für 30 min bei 20 000 *rpm* im Festwinkel-Rotor JA-20 der Beckman-Zentrifuge J2-HS. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, das DNA-haltige Pellet durch evtl. mehrmaliges Waschen mit 70 %igem Ethanol von Salzbeimengungen befreit. Das abschließende Trocknen der DNA geschieht an der Luft, hierbei sublimieren zugleich letzte verbliebene Reste des Ammoniumacetats. Eine vakuumunterstützte Beschleunigung des Trocknungsvorganges führt bei größeren DNA-Molekülen, z. T. auch schon bei Plasmiden, zu Qualitätseinbußen im Material, was sich durch eine oft wesentlich verschlechterte Löslichkeit der getrockneten DNA bemerkbar macht.

3.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA in einer Lösung erfolgt in dieser Arbeit mit Hilfe der sog. UV-Spektroskopie. Hierbei wird das bei 260 nm liegende Absorptionsmaximum von DNA in Lösung verwendet, um über die Extinktion einer Lösung bei dieser Lichtwellenlänge die Konzentration von DNA in der Lösung zu berechnen. Die Messung der Extinktion der zu untersuchenden Lösung erfolgt durch Aufnahme eines kontinuierlichen Absorptionsspektrums von Licht der Wellenlängen 200 bis 320 nm. Als Referenz für die Angabe der Extinktionswerte dienen die entsprechenden Absorptionswerte einer Lösung gleicher Zusammensetzung, die jedoch frei von DNA ist (reiner Puffer oder Wasser). Für eine exakte Berechnung der in der Lösung vorhandenen DNA-Konzentration muss die Lösung frei

von störenden Kontaminanten sein, wie z. B. massivem Proteingehalt oder Phenol. Dies ist der Fall, wenn das Absorptionsspektrum ein deutliches Maximum bei einer Wellenlänge von 280 nm aufweist (erstrebenswert ist hier ein Verhältnis des Extinktionswerts von Licht der Wellenlänge 260 nm zu dem von 280 nm, das den Wert 1.8 oder größer besitzt; Sambrook *et al.*, 1989). Da alle Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, muss die zu bestimmende Lösung vor der Aufnahme des Spektrums gelanalytisch auf die Kontamination mit RNA überprüft werden. Wichtig ist, dass die Lösung, in der sich die DNA befindet, auch keine weiteren stark absorbierenden Bestandteile enthält, wie beispielsweise SAM. Als Referenzwert unspezifischer Absorption wird der Extinktionswert der Lichtwellenlänge 320 nm verwendet, der von dem gemessenen Extinktionswert bei 260 nm abgezogen wird. Aus diesem Differenzwert wird die DNA-Konzentration berechnet. Basis für die Berechnung unter Verwendung des *Dreisatzes* ist, dass eine Lösung von $0.05 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ dsDNA einen Extinktionswert von 1 ergibt, ebenso eine Lösung von $0.033 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ssDNA (Sambrook *et al.*, 1989). Bei stärker konzentrierten DNA-Lösungen ist eine Verdünnung der Lösung vor der Aufnahme des Absorptionsspektrums notwendig, um gut messbare und somit genaue Extinktionswerte zu erhalten. Die Umrechnung der erhaltenen Konzentrationsangabe der DNA von *Gewicht pro Volumen* (w/v) in eine Angabe über die Molarität der DNA erfolgt unter der pauschalisierten Zuordnung eines Molekulargewichtes von 665 Dalton für ein nicht näher spezifiziertes Basenpaar (Natriumsalz; Ausubel *et al.*, 1989), so dass das Molekulargewicht der DNA durch Multiplikation dieses Wertes mit der Anzahl der in der DNA enthaltenen Basenpaare errechnet werden kann.

3.2.6. Enzymatische Manipulation

DNA, die man als Produkt der PCR oder durch Isolation aus Bakterien erhält, entspricht nicht immer den experimentellen Anforderungen. Zwar können mit der PCR-Methode durch Verwendung entsprechender *primer* gezielte Änderungen in einer gegebenen Basensequenz der DNA erzielt und auch Modifikationen in die DNA eingeführt werden, aber oftmals ist eine weitere Abänderung der erhaltenen DNA notwendig. Dies betrifft beispielsweise die Größe der DNA, die Isolierung eines bestimmten Bereiches einer gegebenen DNA-Sequenz, die Verknüpfung (Ligation) bestimmter Sequenzen, die Art der Enden eines linearen DNA-Moleküls (glatte Enden oder definierte Einzelstrang-Überhänge, Phosphorylierungsstatus des 5'-Endes), den Methylierungsstatus der Basen und eine beabsichtigte Markierung der DNA.

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die in dieser Arbeit verwendete DNA mit Hilfe enzymatischer Manipulation an die geforderten Versuchsbedingungen angepasst wird.

3.2.6.a. DNA-Modifikation

Durch enzymatische Modifikationen können bestimmte DNA-Sequenzen an definierten Basenpositionen durch Verwendung von DNA-Methyltransferasen methyliert und der Phosphorylierungsstatus der 5'-Enden geändert werden. Im Folgenden ist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte *in-vitro*-Modifikation von DNA beschrieben.

Methylierung von DNA

Das McrBC Restriktionssystem ist eines der wenigen bekannten Restriktionsenzyme, deren Aktivität obligat von der Anwesenheit methylierter Cytosinreste in einem bestimmten Sequenzkontext abhängt. Für eine Untersuchung der DNA-Bindungs- und -Spaltungseigenschaften des Systems ist daher die Verwendung spezifisch modifizierter DNA unerlässlich. Die entsprechenden Modifikationen können auf verschiedene Weise gewonnen werden, zum Einen durch Methylierung der DNA *in vivo*, zum Anderen durch Methylierung der DNA *in vitro*, und zum Dritten durch Verwendung synthetisch hergestellter Modifikationen, beispielsweise in methylierten *primern* bei der Durchführung der PCR-Methode.

Für die DNA-Methylierung *in vivo* wird in dieser Arbeit die m^5C -Methyltransferase *M.BsuFI* aus *Bacillus subtilis* verwendet. Das für diese Methylase codierende Gen *hsmFI* ist in Plasmiden lokalisiert und wird von den verwendeten Bakterienstämmen konstitutiv exprimiert (näheres hierzu s. Kapitel *pBW201*, S. 45).

Für die *in-vitro*-Methylierung von DNA, beispielsweise von PCR-Produkten, wird in dieser Arbeit die m^5C -Methyltransferase *M.MspI* aus *Moraxella* species verwendet. Diese Methylase erkennt die DNA-Sequenz 5'-CCGG-3' und methyliert den ersten Cytosinrest dieser Sequenz zu 5-Methylcytosin. Steht in der DNA 5' vor dieser Sequenz ein Purinrest, ergibt sich aus der *M.MspI*-Methylierung eine Erkennungssequenz des McrBC-Restriktionssystems (5'-RM-3', mit M = 5-Methylcytosin; näheres hierzu siehe Kapitel *Erkennungssequenzen und Erkennungselemente*, S. 27).

Ein Methylierungsansatz besteht aus un- oder hemimethylierter DNA, dem Enzym *M.MspI* (Fa. *New England Biolabs*, NEB, Schwalbach), 80 μ M frischem S-Adenosylmethionin (SAM, Fa. NEB) und einem Reaktionspuffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA und 2 mM β -Mercaptoethanol (*MspI*-Methylasepuffer, Fa. NEB). Jedes Picomol *M.MspI*-Erkennungssequenzen (5'-CCGG-3', nur in eine Leserichtung gewertet) im

Methylierungsansatz wird mit 0.1 μ M *MspI* für mindestens eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Verwendung als Substrat in Experimenten mit dem McrBC-System wird die *in vitro* modifizierte DNA auf vollständige Methylierung überprüft. Dies geschieht durch den Versuch eines Restriktionsverdau eines Aliquots der erhaltenen, modifizierten DNA mit der *MspI*-Restriktionsendonuklease (Fa. NEB) oder mit *HpaII* (Fa. MBI Fermentas) unter Verwendung des Puffersystems des jeweiligen Herstellers. Beide Enzyme erkennen und schneiden die unmethylierte DNA-Sequenz 5'-C↓CGG-3', aber nicht 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin), das Produkt einer Methylierung durch *M.MspI*. Das Ergebnis des Spaltansatzes wird gelelektrophoretisch analysiert. Erhält man aus dem Spaltansatz der methylierten DNA mit den genannten Restriktionsenzymen Produkte einer spezifischen Spaltung durch diese Enzyme, so muss die DNA mit *M.MspI* nachmethyliert werden. Da es sich bei dieser Kontrolle auf vollständige Methylierung um eine sog. Negativkontrolle handelt (d. h. es wird kein Effekt erwartet), muss parallel zu dem Spaltansatz der zu untersuchenden DNA ein entsprechender Ansatz mit unmethylierter DNA hergestellt werden, um die Funktion der Enzyme unter den gegebenen Bedingungen zu überprüfen.

Dephosphorylierung von DNA

Natürlich vorkommende linear endende Nukleotidketten, wie zum Beispiel die bei der Hydrolyse des DNA-Zuckerphosphatrückgrats durch Restriktionsendonukleasen entstehenden Restriktionsfragmente, besitzen meist eine am 3'-Terminus sitzende Hydroxylgruppe und eine am 5'-Terminus sitzende Phosphatgruppe. Letztere ist nicht immer erwünscht, z. B. bei einigen Ligationsreaktionen (vgl. S. 95), oder soll durch eine Markierung der DNA, z. B. durch eine Phosphatgruppe mit einem radioaktivem Phosphorisotop (vgl. nachstehendes Kapitel), ersetzt werden. Hierzu ist die Abspaltung des 5'-terminalen Phosphatsrests notwendig, die als enzymatisch unterstützte Dephosphorylierungsreaktion durchgeführt werden kann. Das dafür verwendete Enzym ist eine Phosphatase, wobei in dieser Arbeit eine aus Garnelen aufgereinigte alkalische Phosphatase (*Shrimps Alkaline Phosphatase*, SAP) verwendet wird. Das Enzym hydrolysiert die Orthophosphat-Monoester der freien DNA-Enden und setzt den Phosphatrest als anorganisches Phosphation frei. In einem wenige Mikroliter umfassenden Dephosphorylierungsansatz werden 400 ng DNA mit 2.5 μ SAP 30 min bei 37 °C inkubiert, nach dieser Zeit werden weitere 2.5 μ SAP hinzugegeben und nochmals 30 min inkubiert. Das Enzym wird anschließend durch 20minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

Radioaktive Markierung von DNA

Für viele der in dieser Arbeit als Substrat für das Restriktionssystem McrBC verwendeten DNA-Moleküle ist, bedingt durch die geringe Größe und/oder durch die geringe Konzentration der verwendeten DNA bzw. der erhaltenen Restriktionsfragmente, ein Nachweis notwendig, der deutlich empfindlicher ist als der Nachweis der DNA über die Anfärbung mit Ethidiumbromid (vgl. S. 81). Andere Experimente fordern die spezifische Markierung eines bestimmten Stranges der verwendeten DNA. Zu diesem Zweck wird die DNA radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung erfolgt in dieser Arbeit ausschließlich am 5'-Ende eines oder beider DNA-Stränge durch Anfügen einer Phosphatgruppe, die ein radioaktives Phosphorisotop (^{32}P) enthält, mit Hilfe einer durch den Bakteriophagen T4 codierten, aufgereinigten Kinase (T4-Polynukleotidkinase, PNK). Dieses Enzym überträgt die γ -Phosphatgruppe von ATP auf phosphatfreie 5'-Hydroxylenden von Nukleotidketten und ermöglicht so die radioaktive Markierung unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Substrat der Kinase. Prinzipiell katalysiert das Enzym auch eine Austauschreaktion vorhandener 5'-Phosphatreste gegen die γ -Phosphatgruppe von ATP, aber eine reine Phosphorylierungsreaktion von OH-Gruppen läuft deutlich effizienter ab. Aus diesem Grunde werden vor einer radioaktiven Endmarkierung bestehende 5'-Phosphatgruppen der DNA durch eine Phosphatase entfernt (siehe vorheriges Kapitel).

Substrate für eine radioaktive Markierung mit einem ^{32}P -Isotop in der 5'-terminalen Phosphatgruppe sind in dieser Arbeit zum einen doppelsträngige DNA-Moleküle (z. B. aus einer Restriktionsspaltung resultierende DNA-Fragmente) oder DNA-Einzelstränge, die für eine Substratgenerierung durch Einzelstrang-Hybridisierung (vgl. S. 83) oder PCR (Verwendung radioaktiv markierter *primer*; vgl. S. 81) verwendet werden. Bei einer radioaktiven Markierung der 5'-Enden von DNA-Doppelsträngen ist zu beachten, dass beide Enden markiert werden (wobei oftmals die Möglichkeit einer Abspaltung eines Endes der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen besteht), während eine Einzelstrang-Phosphorylierung die selektive Markierung eines definierten Stranges ermöglicht. Ein Phosphorylierungsansatz enthält pro Picomol eingesetzter 5'-Enden 1 bis 10 pmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (vgl. S. 56) und 5 μ PNK in einem Reaktionsvolumen von max. 50 μl . Als Puffersystem dient der vom Hersteller der T4-PNK vorgesehene Puffer. Das Enzym wird nach der einstündigen Phosphorylierungsreaktion bei 37 °C durch 20minütiges Erhitzen auf 75 °C denaturiert.

3.2.6.b. Restriktionsverdau

Die in der Einleitung dieser Arbeit beschriebene Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen, bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen und die DNA bei Vorliegen solcher Sequenzen zu schneiden (vgl. S. 2 ff.), wird im Labor für gentechnische Arbeiten ausgenutzt. Besonders die Typ II Restriktionsenzyme (s. S. 7) sind durch ihre kurzen, definierten Erkennungssequenzen, die definierten Positionen ihrer Phosphodiester-Hydrolysereaktion und die große Anzahl an kommerziell verfügbaren, unterschiedlichen Enzymen dazu geeignet, DNA-Moleküle an bestimmten Positionen zu schneiden und dadurch Restriktionsfragmente gewünschter Größe (und mit gewünschten Enden, vgl. Kapitel *Ligation*, S. 95) zu erhalten. Abgesehen von Experimenten, die der Erforschung des Restriktionsenzym selbst dienen, werden restriktionsenzymatische DNA-Spaltungen beispielsweise für die Überprüfung von DNA-Molekülen verwendet (sog. *Markerspaltungen*, bei denen das Vorhandensein bestimmter Schnittstellen in der DNA nachgewiesen wird, oder sog. *Restriktionskartierungen*, bei denen das sich aus dem Verdau der DNA mit meist verschiedenen Restriktionsenzymen ergebene Schnittmuster dazu verwendet wird, die Identität der DNA zu ermitteln), oder dienen der Herstellung definierter DNA-Fragmente (z. B. für gentechnische Arbeiten, bei denen zwei erhaltene Fragmente durch *Ligation* miteinander zu einem neuen DNA-Molekül verbunden werden, oder für die Präparation von DNA als Substrat in experimentellen Untersuchungen). Eine mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführte DNA-Spaltung kann also einem analytischen oder einem präparativen Zweck dienen. Beide Arten des Restriktionsverdaus werden in dieser Arbeit angewendet und werden in ihrer Durchführung nachfolgend beschrieben.

Analytischer Restriktionsverdau

Diese Art der restriktionsenzymatisch bewirkten DNA-Spaltung dient dazu, eine bestimmte Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease in einem DNA-Molekül nachzuweisen (*Markerspaltung*) bzw. die Größen der aus der DNA-Spaltung resultierenden DNA-Fragmente zu ermitteln (die dadurch möglichen Rückschlüsse auf die Lage der verwendeten Restriktions-Schnittstellen im eingesetzten DNA-Substrat nennt man *Restriktionskartierung*). Aufgrund des analytischen Vorhabens werden bei dieser Art von Restriktionsverdau so wenig als möglich DNA und Restriktionsenzym in den Spaltungsansatz eingesetzt. Die genaue Menge der einzusetzenden DNA hängt vor allem von der vorgesehenen Auswertung der Analyse ab (Art der Auftrennung der DNA-Fragmente, z. B. mit verschiedenen Elektrophorese-Systemen, vgl. Kapitel *DNA-Gele und Dokumentation*, S. 76; Nachweis der DNA,

z. B. Anfärbung mit Ethidiumbromid, vgl. S. 81, oder durch Radioaktivität, vgl. S. 99). Die einzusetzende Menge an Restriktionsenzym richtet sich primär nach der eingesetzten Menge an DNA (bzw. aus der sich daraus ergebenden Menge an vorhandenen Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym), den Milieubedingungen im Reaktionsansatz (die durch die Verwendung der vom jeweiligen Enzymlieferanten angegebenen Puffer meist *optimal* sind) und der vorgesehenen Inkubationszeit. Allgemein besteht ein analytischer Restriktionsansatz aus einem Volumen von 10 µl, in dem einige Nanogramm DNA (Plasmide: 100 bis 200 ng) mit 1 bis 5 *u* Restriktionsenzym in einem für das Enzym geeigneten Puffer für eine Stunde bei, sofern nicht anders angegeben, 37 °C inkubiert wird. Die Inkubation analytischer Spaltansätze geschieht in temperaturregulierbaren Heizblöcken (Dri-Block DB-3, Fa. Techne Inc., Princeton, USA). Parallel zu dem Ansatz wird die Aktivität des verwendeten Enzyms unter gleichen Bedingungen an einem DNA-Substrat überprüft, mit dem das Enzym ein bekanntes Fragmentmuster produziert. Bei einer vorgesehenen analytischen Spaltung der DNA durch mehrere verschiedene Restriktionsenzyme in einem Reaktionsansatz werden zusätzlich parallele Ansätze unter Einsatz jeweils nur eines der verwendeten Restriktionsenzyme als Kontrolle angefertigt. Ist ein Mehrfachverdau von DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen in einem Ansatz durch mangelnde oder gar fehlende Aktivität mindestens eines der verwendeten Enzyme nicht möglich, werden die verschiedenen restriktionsenzymatischen Spaltungen nacheinander durchgeführt, wobei die aus einem Spaltansatz resultierenden DNA-Fragmente vor ihrem Einsatz in die nächste Spaltreaktion aufgereinigt werden (vgl. Kapitel *Aufreinigung von DNA*, S. 84). Die enzymatische Reaktion der analytischen DNA-Spaltungen wird durch Denaturierung des Enzyms (Erwärmung des Ansatzes auf 65 bis 75 °C und Inkubation des Ansatzes für 15 bis 20 min bei dieser Temperatur) oder durch Zusatz einer durch die Art der nachfolgenden Auswertung bestimmten Lösung (z. B. ein Auftragspuffer für gelelektrophoretische Analysen, vgl. S. 76, oder reine EDTA-Lösung) gestoppt.

Präparativer Restriktionsverdau

Die DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen kann auch der Herstellung von definierten DNA-Fragmenten dienen. Bei solchen Vorhaben sollen die bei der restriktionsenzymatischen Spaltung entstandenen Produkte zumindest teilweise für weitere Arbeiten weiterverwendet werden (z. B. für Ligationen oder als Substrat in experimentellen Untersuchungen) und müssen daher in ausreichender Menge entstehen. Der Unterschied zu der oben beschriebenen analytischen Restriktionsspaltung besteht lediglich in der Größe des

verwendeten Spaltansatzes, der für präparative Zwecke aus deutlich mehr DNA ($> 10 \mu\text{g}$) und Restriktionsenzym in einem größeren Reaktionsvolumen ($> 100 \mu\text{l}$) besteht, und den sich daraus ergebenden Inkubationsbedingungen. Die Menge des verwendeten Restriktionsenzyms ist dabei in Relation zur eingesetzten DNA-Menge gegenüber dem analytischen Restriktionsverdau nur geringfügig erhöht (10 bis 20 u), was durch eine längere Inkubationszeit (mehrere Stunden bis über Nacht) kompensiert wird. Die Inkubation des präparativen Spaltansatz erfolgt in einem Wärmeschrank (Fa. Memmert, Schwabach) bei 37°C oder bei Raumtemperatur. Vor der Isolierung des gewünschten DNA-Fragmentes bzw. der gewünschten DNA-Fragmente (vgl. Kapitel *Präparative Agarose-Gele*, S. 86) wird der präparative Spaltansatz auf vollständig erfolgte enzymatische DNA-Spaltung kontrolliert (vgl. Kapitel *DNA-Gele und deren Dokumentation*, S. 76).

3.2.6.c. Ligation

Eine Ligation ist die enzymatisch unterstützte Verknüpfung zweier DNA-Moleküle unter Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen dem 5'-Phosphatrest des einen DNA-Moleküls und der 3'-Hydroxylgruppe des anderen Moleküls. Gängigerweise sind die zu ligierenden DNA-Substrate doppelsträngig und besitzen 5'-terminale Phosphatreste, so dass die Ligationsreaktion in beiden Strängen erfolgen kann. Je nachdem weiteren für die DNA vorgesehenen Zweck reicht jedoch in der Regel die Ligation eines Stranges aus, um ein stabiles Fusionsmolekül zu erhalten. So brauchen nicht beide 5'-Enden zweier miteinander zu ligierender DNA-Doppelstränge eine endständige Phosphatgruppe zu besitzen, um eine Verbindung zu erhalten, die beispielsweise stabil genug für eine Transformation der erhaltenen DNA in Bakterien ist. Dies kann für eine Erhöhung der Effizienz bei einer gewünschten Zirkularisierung zweier linearer DNA-Doppelstränge ausgenutzt werden, wobei beide DNA-Stränge verschiedene, aber jeweils zum anderen DNA-Strang komplementäre Enden besitzen, einer der beiden DNA-Stränge jedoch keine Phosphatreste an seinen 5'-Enden besitzt. Dies verhindert die Religation der beiden Enden des 5'-phosphatlosen Molekültyps.

Ein Ligationsansatz besteht aus einem geringen Volumen, in dem das für die Ligationsreaktion verwendete Enzym, die DNA-Ligase, mit den zu verbindenden DNA-Molekülen unter geeigneten Pufferbedingungen konfrontiert wird. Die Ligationsreaktion ist theoretisch umso effizienter, je höher die Konzentration an zueinander passenden DNA-Enden ist, jedoch wächst mit steigender Konzentration eines Ligationspartners mit 5'-ständigen Phosphatresten die Rate nicht gewünschter Verknüpfungen von Molekülen

gleicher Herkunft. Es hängt von der Art der zu ligierenden Moleküle ab, in welchen absoluten und relativen Konzentrationen sie in die Ligationsreaktion optimal eingesetzt werden können. Dabei spielen die Molekülgrößen sowie die Ausbildung ihrer Enden eine wesentliche Rolle. Abgesehen von dem bereits erwähnten Unterschied zwischen Vorhandensein und Fehlen der 5'-ständigen Phosphatgruppe können doppelsträngige DNA-Moleküle ein doppelsträngiges Ende (sog. "glattes" Ende, engl. *blunt end*) oder ein einzelsträngiges Ende (engl. *sticky end*) besitzen, wobei sich letzteres durch das Vorhandensein eines sog. Einzelstrang-"Überhangs" am 3'- oder am 5'-Ende auszeichnet. Ein Einzelstrangüberhang am Ende der DNA erlaubt die spezifische Ligation mit einer DNA, die einen entsprechend komplementären oder teilkomplementären Überhang an ihrem Ende besitzt. Nicht nur DNA-Moleküle, die mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten werden, besitzen solche zueinander passenden Enden, sondern auch solche, die mit Hilfe von Restriktionsenzymen erzeugt werden, die komplementäre Überhänge hinterlassen. Ein Beispiel ist die in dieser Arbeit durchgeführte Ligation von *AsuII*- und *ClaI*-geschnittenen DNA-Fragmenten (vgl. Kapitel *pMcrSb1*, S. 183).

Als Biokatalysator wird in dieser Arbeit die durch den Bakteriophagen T4 codierte DNA-Ligase in dem vom Hersteller (AGS, Heidelberg) entwickelten Puffersystem verwendet, das durch Zusatz von 4 mM DTT, 5 % (w/v) Polyethylenglykol (PEG 6000) und 1 mM ATP in seiner Zusammensetzung erweitert wird. Für eine *sticky-end*-Ligation eines Oligodesoxynukleotids (ohne 5'-endständige Phosphatgruppen) mit einem linearisierten Plasmid werden 12.5 nM Oligodesoxynukleotid und 1.8 nM Plasmid-DNA in den Reaktionsansatz gegeben, für eine Ligation von Plasmidfragmenten (*sticky*- oder *blunt ends*, nicht 5'-dephosphoryliert) äquivalente Mengen (jeweils 0.1 bis 1 nM) beider Reaktionspartner. Die Ligation erfolgt für mehrere Stunden (bzw. über Nacht) bei 16 °C.

3.2.7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt in dieser Arbeit mit Hilfe einer PCR-Reaktion unter Verwendung von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), die einen Zusatz fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs, sog. *Stop-Nukleotide*) enthalten. Diese Art der Sequenzierung ist eine moderne Variante der synthetisierenden Methode nach Sanger (Sanger & Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977). Jede Art von ddNTP enthält einen anderen, der jeweiligen Base zugeordneten Fluoreszenzfarbstoff. Dies erlaubt

eine einfache, schnelle und trotzdem genaue Sequenzierung mit einem computerunterstützten Kapillarelektrophorese-Sequenziergerät.

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird zunächst einer speziellen Sequenzier-PCR unterworfen. Der dabei verwendete Reaktionsmix (*AmpliTaq*[®], *FS Dye Terminator* Premix der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA) enthält abweichend von den oben genannten Bedingungen (s. Kapitel *PCR*, S. 81) neben den dNTPs zusätzlich die fluoreszenzmarkierten Stopnukleotide, sowie *AmpliTaq*[®] als DNA-Polymerase (Konzentrationen jeweils nach Herstellerangaben). Ein 20 µl umfassender Reaktionsansatz enthält einen *primer* (*forward-primer* oder *reverse-primer*, 0.5 µM), etwa 500 ng *dsDNA* als *template* (hier Plasmid-DNA) und 40 % (v/v) *Terminator*-Premix in einem *MicroAmp*[®]-Reaktionsgefäß (Fa. Applied Biosystems, Norwalk, USA). Das für die Sequenzier-PCR notwendige Temperatur-Profil wird durch den Thermocycler 2400 (Fa. Applied Biosystems; hierbei wird der PCR-Reaktionsmix nicht mit Paraffin-Öl überschichtet) erzielt. Es setzt sich aus sich wiederholenden Zyklen folgender Temperaturen zusammen: sofortiges Erhitzen auf 96 °C → 20 s *DNA-Denaturierung* bei 96 °C → Abkühlung auf 50 °C innerhalb von 30 s → 15 s *primer-Hybridisierung* bei 50 °C → Erwärmung auf 60 °C innerhalb von 10 s → 4 min *DNA-Synthese* bei 60 °C. Nach 25 Zyklen wird der Reaktionsmix sofort auf 4 °C abgekühlt. Es erfolgt eine Ethanol- und Ammoniumacetat-unterstützte Fällung der DNA (siehe Kapitel *DNA-Fällung aus Lösungen*, S. 87), die in 25 µl *TSR* (*Template Suppression Reagent*, Fa. Applied Biosystems) 2 min lang auf 90 °C erhitzt wird.

Die Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* Sequenziergerätes nach Anleitung und unter Verwendung von Agenzien der Herstellerfirma Applied Biosystems. In diesem Gerät werden die bei der Sequenzier-PCR entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe einer Kapillar-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wird für jede Fragmentgröße der durch das Stop-Nukleotid eingeführte Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe eines optischen Systems erkannt. Die computerunterstützte Auswertung (Software *ABI-CE1*, Version 3.0, Fa. Perkin-Elmer) erlaubt eine gute Beurteilung der Qualität der erhaltenen Daten.

3.2.8. Transformation

Für eine Reihe von Verfahren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet werden, muss DNA (hier Plasmide) in Bakterien eingeschleust werden. Für diese sog. Transformation werden spezielle, für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetente Bakterien (vgl. S. 62)

verwendet. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien wird durch spezielle Milieubedingungen (kalziumkompetente Zellen) oder durch Einwirkung des elektrischen Feldes (elektrokompetente Zellen) gefördert. Beide Transformationsverfahren werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.2.8.a. Elektrotransformation

Die Elektrotransformation erfolgt unter Verwendung eines Elektroporationsgerätes der Firma Invitrogen. Dieses erzeugt in einer speziellen Plastikkuvette, in die eine Mischung aus elektrokompetenten Bakterienzellen (s. S. 62) und der zu transformierenden DNA eingefüllt wird, einen starken Stromimpuls. Bei der Elektrotransformation darf die Dichte der Bakterien nicht höher als $2 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml⁻¹ sein, um durch den elektrischen Strom induzierte Zellfusionen zu vermeiden. Die bei -70 °C gelagerten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Wichtig ist eine gute Kühlung der Bakterien auf Eis vor der Transformation und ein schnelles Mischen der Bakterien mit SOC-Medium (s. S. 37) nach der Transformation (s.u.). Selbstverständlich muss steril gearbeitet werden. Die zu transformierende DNA wird vor ihrer Vermischung mit den kompetenten Bakterien durch eine ethanolunterstützte DNA-Fällung (vgl. S. 87) von Salzbestandteilen in der Lösung befreit, um die Leitfähigkeit der Lösung so gering wie möglich zu halten. Es sollten maximal 500 ng DNA pro 80 µl Zellen eingesetzt werden. Das Zell-DNA-Gemisch wird zügig in die Elektroporationskuvette überführt, dabei dürfen keine Luftblasen in der Küvette bleiben. Nach Verschließen der Küvette werden die Zellen durch einen Stromstoß transformiert, sofort mit 1 bis 2 ml SOC-Medium (RT) gemischt und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert (gelegentlich schwenken). Nach der Inkubation in SOC-Medium werden die Bakterien auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten Agar-Festmedien (vgl. S. 38) ausplattiert. Für eine Bestimmung der Transformationsausbeute werden zwei Platten mit unterschiedlichen Bakterienmengen bestrichen. Auf einer Platte werden 50 µl des Ansatzes ausgestrichen, auf der anderen der Rest. Um das auszustreichende Flüssigkeitsvolumen zu verringern, werden die Bakterien nach Entnahme des 50-µl-Aliquots in einer Tischzentrifuge (Typ 5417C mit Festwinkelrotor F45-30-11 der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) 1 bis 2 min bei langsamer Rotationsgeschwindigkeit (1000 bis 2000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet im dabei hängenbleibenden Restvolumen des Überstandes resuspendiert und ausgestrichen. Die Agar-Festmedien werden über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass transformierte Bakterien sichtbare Klon-Kolonien bilden können.

3.2.8.b. Kalziumunterstützte Transformation

Die Transformation sog. kalziumkompetenter Zellen (s. S. 63) mit DNA erfolgt in Gegenwart zweiwertiger Metallionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}). Die einzuschleusende DNA wird nach einer ethanolunterstützten Fällung (vgl. S. 87) in einer Lösung aus 100 mM CaCl_2 resuspendiert. 1 bis 100 ng DNA werden mit den langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen, die zuvor bei -70°C gelagert wurden, vermischt und eine Stunde lang unter Eiskühlung inkubiert. Anschließend erfolgt ein relativer Hitzeschock durch eine schnelle Erwärmung der Lösung auf 42°C . Nach dreiminütiger Inkubation bei dieser Temperatur werden die transformierten Bakterien auf Eis abgeschreckt, anschließend mit 500 μl LB-Medium (s. S. 37) vermischt und eine Stunde bei 37°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Das Ausplattieren der Bakterien auf Agar-Nährmedien (Selektivplatten) erfolgt wie für die Elektrotransformation beschrieben (siehe vorheriges Kapitel).

3.3. Radioaktivität

In der vorliegenden Arbeit wird in vielen experimentellen Ansätzen vom Einsatz radioaktiv markierter Reagenzien Gebrauch gemacht. Einziges verwendetes radioaktives Nuklid ist das Phosphor-Isotop ^{32}P (vgl. Kapitel *Radioaktive Nuklide*, S. 56), das für radioaktive Markierungen von DNA-Molekülen verwendet wird (vgl. Kapitel *Radioaktive Markierung von DNA*, S. 92). Die Arbeit mit Radioaktivität geschieht im Rahmen der dafür vorgesehenen Sicherheitsbestimmungen. Um eine bestmögliche Auswertung der Experimente zu erhalten ist es wichtig zu wissen, wieviel Radioaktivität in den experimentellen Ansatz optimal einzusetzen ist. Dies richtet sich nach der vorgesehenen Nachweismethode und setzt die Kenntnis der Radioaktivität in den verwendeten Stammlösungen voraus. Im Anschluss an die folgende Beschreibung der angewendeten Nachweismethoden der eingesetzten Radioaktivität ist das angewendete Verfahren zur Bestimmung der in einer DNA-Stammlösung enthaltenen spezifischen Radioaktivität erläutert.

3.3.1. Nachweismethoden

Der qualitative und quantitative Nachweis von ^{32}P in experimentellen Untersuchungen erfolgt durch Ausnutzung der Fähigkeit der emittierten β -Strahlung, Röntgenfilme schwärzen zu können, oder mittels Verwendung eines elektronischen Autoradiografiegerätes (*Instant Imager*), das eine direkte Visualisierung der radioaktiven Verteilung in zweidimensionalen

Vorlagen und eine anschließende computerunterstützte Auswertung gestattet. Beide autoradiografischen Nachweisverfahren sind im Folgenden beschrieben.

3.3.1.a. Elektronische Autoradiografie

Die Autoradiografie ist ein Verfahren, Radioaktivität über ein fotografisches Verfahren nachzuweisen. Bei der elektronisch unterstützten Autoradiografie erfolgt der Nachweis nicht über die Belichtung eines Films (vgl. nachstehendes Kapitel *Röntgenfilm*), sondern über elektronische Detektoren, mit deren Hilfe ein sichtbares Bild auf einem Monitor erstellt wird. Das in dieser Arbeit verwendete Gerät ist der *Instant Imager* der Firma Canberra Packard (Meriden, USA). Dieses Gerät kann die Verteilung und die Intensität von Radioaktivität in zweidimensionalen Vorlagen, wie z. B. dünnen Gelen aus Elektrophoresen, bestimmen und über einen Computer grafisch auf einem Monitor darstellen. Die dafür verwendete, zum Gerät gehörende *Software* der Fa. Canberra Packard erlaubt zusätzlich eine Auswertung der erhaltenen Daten. Durch den *Instant Imager* erfolgt keine direkte Messung der radioaktiven Strahlen, sondern es werden durch ionisiertes Zählgas verursachte elektrische Entladungen erfasst. Das Zählgas besteht aus 96.5 % (v/v) Argon, 2.5 % (v/v) CO₂ und 1 % (v/v) Isobutan und wird durch eine zuvor evakuierte Kammer über die radioaktive Probe geleitet, wo es durch radioaktive Strahlung ionisiert wird. Die elektronisch unterstützte Autoradiografie ist also ein indirektes Nachweisverfahren für Radioaktivität, gestattet aber die direkte Beobachtung der visualisierten radioaktiven Messung, da das auf dem Monitor gezeigte Autoradiogramm nach jeweils wenigen Sekunden aktualisiert wird. Dadurch ermöglicht dieses Verfahren eine wesentlich schnellere Auswertung der radioaktiven Probe als es durch die Analyse der Radioaktivität mit einem Röntgenfilm (s. u.) möglich ist, allerdings ist die dabei erreichte Auflösung deutlich geringer. Die Dauer der Messung mit dem *Instant Imager* richtet sich primär nach der Verteilung und der Intensität der zu erfassenden radioaktiven Strahlung und kann durch die sofortige Verfügbarkeit der Daten optimal angepasst werden.

Für eine Auswertung mit dem *Instant Imager* eignen sich dünne Polyacrylamid-Gele, z. T. auch sehr dünne Agarose-Gele, die aus gelelektrophoretischen Analyseverfahren (vgl. Kapitel *DNA-Gele und deren Dokumentation*, S. 76) stammen. Eine durch saugfähiges Papier und Vakkum unterstütztes Trocknen der Polyacrylamid-Gele kann zu einer höher aufgelösten Abbildung der Radioaktivität im Gel führen. Leider ist die maximale Größe der auszuwertenden Gele bei der Verwendung des *Instant-Imager*-Systems auf eine Länge von etwa 30 cm beschränkt, so dass Gele, die unter Verwendung des *Base-Runner*-Elektro-

phoresesystems hergestellt werden (vgl. Kapitel *Denaturierende Polyacrylamid-Gele*, S. 80), nicht mit dem *Instant Imager* ausgewertet werden können.

3.3.1.b. Röntgenfilm

Der autoradiografische Nachweis von Radioaktivität mit Röntgenfilmen ist der elektronischen Autoradiografie in der erzielbaren Auflösung deutlich überlegen, besitzt aber den Nachteil einer langen Expositionsdauer, so dass die Daten bei weitem nicht so schnell verfügbar sind wie die elektronisch erstellten Daten des *Instant-Imager*-Gerätes. Die Dokumentation der durch elektrophoretische Analyse erhaltenen Ergebnisse aus Experimenten mit radioaktiv markierter DNA erfolgt in dieser Arbeit mit Hilfe von Röntgenfilmen, sofern eine hohe Auflösung der Autoradiografie erforderlich ist oder die Gele zu groß für eine elektronische Autoradiografie sind (vgl. vorheriges Kapitel). Die bei diesem Verfahren verwendeten Röntgenfilme (*XOMATAR*, Fa. Kodak) unterscheiden sich von konventionellen Filmen lediglich durch einen höheren Silbergehalt und gröberes Korn, ebenso unterscheiden sich die bei der Bestrahlung mit Radioaktivität ablaufenden Prozesse prinzipiell wenig von einem fotografischen Prozess mit sichtbarem Licht. Auch hier enthalten die im Fotomaterial vorhandenen Silberhalogenidkristalle Spuren von Ag_2S . An diesen Störstellen in den Kristallen bewirken die durch radioaktive Strahlung ausgelösten Ionisationsprozesse die akkumulierende Reduktion von Ag^+ -Ionen zu atomarem Silber. Nach der meist mehrtägigen Exposition (s. u.) kann aus dem latenten Bild der reduzierten Silberkeime durch Entwicklung des Films ein sichtbares Bild produziert werden, indem bei dem Entwicklungsprozess die noch vorhandenen Silber-Kationen durch die Entwicklerflüssigkeit reduziert werden und sich an den bereits gebildeten Silberkeimen anlagern. Durch diesen Vorgang wird das latente Bild um den Faktor 10^9 verstärkt. Die nicht entwickelten Silberkristalle werden durch die anschließende Fixierung entfernt, so dass nach Waschen des Films mit Wasser und anschließendem Trocknen das Autoradiogramm zur Verfügung steht.

Die erhaltene Schwärzung des Röntgenfilms ist von der Expositionszeit, der Radioaktivität und der Empfindlichkeit des verwendeten Röntgenfilms abhängig. In dieser Arbeit werden Polyacrylamid-Gele mit radioaktiven Proben, die mit Hilfe von Röntgenfilmen dokumentiert werden sollen, ohne Trocknungsprozess in handelsübliche Haushalts-Frischhaltefolie eingepackt und in einer lichtdichten Kassette verschlossen, wo sie einem Röntgenfilm aufliegen. Damit sich die Struktur der Gele während der Inkubationsdauer nicht verändert, geschieht die Exposition bei -70°C . Durch Verwendung sog. phosphoreszierender

Verstärkerfolien wird dabei die durch die radioaktiven Strahlen erzielte Bestrahlung des Films intensiviert, was die Expositionsdauer verkürzt.

3.3.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität

Bei der spezifischen Radioaktivität handelt es sich um die auf die Stoffmenge bezogene Aktivität, die in $\text{Bq} \cdot \text{mol}^{-1}$ angegeben wird. Sie ist abhängig von der Effizienz des Einbaus des radioaktiven Nuklids in das gewünschte Molekül, was sich in dieser Arbeit auf den Erfolg der radioaktiven Markierung von DNA bezieht (vgl. S. 92), und der Halbwertszeit des Nuklids (in dieser Arbeit nur ^{32}P , vgl. Kapitel *Radioaktive Nuklide*, S. 56). Ist *jedes* DNA-Molekül mit *einem* ^{32}P -Isotop (Halbwertszeit 14.3 Tage) markiert, beträgt die spezifische Aktivität dieser DNA $338 \cdot 10^9 \text{ Bq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$. Die spezifische Aktivität einer Lösung mit radioaktiv markierter DNA wird in dieser Arbeit mit Hilfe des *Instant Imager* (vgl. Kapitel *Elektronische Autoradiografie*, S. 100) bestimmt. Hierzu wird ein definiertes Volumen der zu untersuchenden DNA-Lösung für einige Minuten im *Instant Imager* inkubiert. Aus der Dauer der Messung, dem eingesetzten Probenvolumen und der Konzentration der DNA in dieser Lösung (vgl. Kapitel *Konzentrationsbestimmung von DNA*, S. 88) läßt sich aus der durch die Messung erhaltenen radioaktiven Zerfallszahl ein der spezifischen Radioaktivität der eingesetzten Lösung proportionaler Wert berechnen. Im hiesigen Institut hat sich die Angabe der Aktivität in *counts per minute (cpm)* durchgesetzt, eine Einheit, die sich auf die tatsächlich gemessenen radioaktiven Zerfälle bezieht. Abgesehen von dem Unterschied im zeitlichen Bezug dieser Angabe (die Einheit *cpm* bezieht sich, wie namentlich festgehalten, auf die Anzahl der gemessenen radiaktiven Zerfälle pro Minute, während sich die Einheit *Bequerel* auf eine Zeitspanne von einer Sekunde bezieht; vgl. S. XIII) basiert der bestimmte *cpm*-Wert auf Messungen mit dem *Instant Imager* und hängt somit in starkem Maße von der Messempfindlichkeit des Gerätes ab. Dadurch weicht der durch den *Instant Imager* bestimmte *cpm*-Wert teilweise deutlich von den erhaltenen Werten anderer Messinstrumente (beispielsweise dem Szintillationszähler *1600 TR* der Firma Canberra Packard) oder der tatsächlich vorhandenen Radioaktivität ab. Diese Abweichungen können aber vernachlässigt werden, da die für Berechnungen verwendeten *cpm*-Werte immer durch Messung mit dem gleichen Gerät bestimmt werden und bei der Auswertung der Experimente wieder auf tatsächlich vorhandene Stoffmengen oder Konzentrationen umgerechnet werden.

3.4. Untersuchung der Restriktionsendonuklease McrBC

Die Untersuchung der komplexen GTP-abhängigen Restriktionsendonuklease McrBC aus *Escherichia coli* K-12 ist zentrales Thema der vorliegenden Arbeit. Der Schwerpunkt der Analysen liegt dabei klar auf der Charakterisierung der das Restriktionssystem auszeichnenden DNA-Bindungs- und Spaltungseigenschaften. Auch die Untersuchungen zur Proteinstabilität beziehen sich im Wesentlichen auf diese Thematik. Dies bedeutet, dass die zweite charakteristische Eigenschaft der McrBC-Nuklease, nämlich die Fähigkeit zur Bindung und Hydrolyse von GTP, nur am Rande betrachtet wird. Die Untersuchung der DNA-Bindung und -Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem erfolgt durch nachfolgend beschriebene Experimente, die sich primär mit dem Phänomen der DNA-Bindung durch McrBC beschäftigen, *oder* im Wesentlichen eine Analyse der DNA-Spaltung darstellen. Die Auswertung der jeweiligen Experimente betrachtet den qualitativen, zum Teil auch den quantitativen Charakter des untersuchten Ereignisses.

3.4.1. Thermischer Einfluss auf die Proteinstabilität

In einigen Experimenten dieser Arbeit werden Eigenschaften von Deletionsvarianten des McrB-Proteins im Vergleich zum Protein voller Länge untersucht. Zur Charakterisierung der aminoterminalen Domäne von McrB, die aus den Aminosäureresten 1 bis 170 des McrB-Proteins besteht (als McrB₁₋₁₇₀ bezeichnet) und DNA-bindende Eigenschaften besitzt, wird der Einfluss einer Inkubation von McrB bzw. von McrB₁₋₁₇₀ mit unterschiedlicher Zeiten und Temperaturen auf die Fähigkeit der DNA-Bindung untersucht. Hierzu werden 2 µM GST-McrB bzw. McrB₁₋₁₇₀ in Anwesenheit von 200 ng · µl⁻¹ BSA in HMD-Puffer (mit Zusatz von 10 % [v/v] Glycerin; als HMD/Gly-Puffer bezeichnet) für 15 und 30 min, sowie für 1, 2 und 4 h bei 0, 25 bzw. 37 °C inkubiert. Der Einfluss dieser Inkubation wird mit Hilfe der *mobility-shift*-Methode (vgl. S. 104) untersucht. Hierzu wird der inkubierte Ansatz mit dem gleichen Volumen einer Lösung versetzt, die das Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 (vgl. S. 134) in einer Konzentration von 1 µM in HMD/Gly-Puffer mit 200 ng · µl⁻¹ BSA enthält, so dass die Konzentrationen 1 µM McrB bzw. McrB₁₋₁₇₀ und 0.5 µM Sb61-11.11 eingestellt werden. Die Bindung der McrB-Proteine an die DNA wird nach 20minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis mit einem *mobility-shift*-Gel analysiert (vgl. S. 78).

3.4.2. *In-trans*-Aktivierung

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, besitzt das Restriktionssystem McrBC zwar die Fähigkeit, an eine singuläre Erkennungssequenz zu binden, benötigt jedoch in einem linearen DNA-Molekül zwei solcher Sequenzen in einem gewissen Abstand, um dieses Substrat spalten zu können. In der vorliegenden Arbeit wird die Möglichkeit einer *in-trans*-Aktivierung der Restriktionsendonuklease McrBC überprüft. Hierzu werden kurze DNA-Moleküle, die mindestens eine McrBC-Erkennungssequenz besitzen, aber bei alleiniger Anwesenheit nicht durch das McrBC-System spaltbar sind, gemeinsam mit spaltbarer Plasmid-DNA in einem Ansatz mit McrBC inkubiert (vgl. Kapitel *DNA-Spaltung*, S. 111). Der Einfluss verschiedener Konzentrationsverhältnisse von Oligodesoxynukleotid und Plasmid im Spaltansatz wird gelelektrophoretisch analysiert (vgl. Kapitel *DNA-Gele und Dokumentation*, S. 76).

3.4.3. DNA-Bindung

Eine DNA-Bindung durch eine Restriktionsendonuklease erfolgt unter geeigneten Bedingungen an einer für das jeweilige Enzym charakteristischen Basensequenz (*spezifische* DNA-Bindung an der Erkennungssequenz), kann aber zum Teil auch an einer nicht definierten Basensequenz der DNA stattfinden (sog. *unspezifische* Bindung). Die nachfolgend beschriebenen Experimente analysieren schwerpunktmäßig dieses Phänomen für die Restriktionsendonuklease McrBC, deren charakteristisches Merkmal die Spaltung und somit auch die Bindung spezifisch methylierter DNA-Sequenzen ist. Die dabei im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen beschriebenen Experimente, die auf rasterkraftmikroskopischen Analysen oder auf Untersuchungen der Oberflächen-Plasmonresonanz mit BIAcore-Instrumenten beruhen, dienen teilweise auch der Analyse der DNA-Spaltung durch McrBC.

3.4.3.a. *Mobility-shift*-Experimente

In dieser Arbeit wird das DNA-Bindungsverhalten von McrB, Derivaten von McrB (einschließlich McrB_s) sowie von McrC mit Hilfe der *mobility-shift*-Elektrophorese untersucht. Die hierfür verwendeten McrBC-Proteine sind die im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten GST-Fusionsprodukte von McrB, McrB_s und McrC sowie N-terminale Abschnitte von McrB (sog. Deletionsvarianten, die durch genetisch bedingten vorzeitigen Translationsstop und nicht durch Proteolyse produziert wurden), bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 162, 1 bis 170 sowie 1 bis 190 des McrB-Proteins, die als GST-

Fusionsprodukt von U. Pieper, Gießen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Als spezifisches DNA-Substrat für die *mobility-shift*-Untersuchungen dient zum einen das 61 bp lange, doppelsträngige Sb61-11.11, das zwei Erkennungselemente (vgl. Kapitel *Erkennungssequenzen und Erkennungselemente*, S. 27) für McrBC enthält, die aus jeweils zwei Erkennungssequenzen von McrBC bestehen (s. Kapitel *Sb61-11.11*, S. 134), zum anderen aus unterschiedlich methylierten Varianten der 128 bp langen Sb128-DNA (s. S. 141), die sich in der Anzahl der McrBC-Erkennungssequenzen unterscheiden. Die verwendete DNA ist zum Teil für einen sensitiveren Nachweis radioaktiv markiert (vgl. Kapitel *Radioaktive Markierung von DNA*, S. 92, und Kapitel *Radioaktivität*, S. 99). Für die *mobility-shift*-Experimente wird der verwendete Puffer (HED/Gly, bestehend aus 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTE; 1 mM EDTA und 10 % (v/v) Glycerin, oder HMD/Gly, bestehend aus HED/Gly ohne EDTA, mit Zusatz von 10 mM MgCl₂) zusätzlich mit 200 µg · ml⁻¹ BSA versetzt. Die Inkubation der jeweils 10 µl umfassenden Bindungsansätze erfolgt für 10 bis 20 min bei Raumtemperatur oder auf Eis. Vor dem Auftrag auf ein *mobility-shift*-Gel wird der Bindungsansatz mit einem speziellen Auftragspuffer versetzt (vgl. Kapitel *Mobility-shift-Gele*, S. 78).

3.4.3.b. Oberflächen-Plasmonresonanz

Wechselwirkungen zwischen größeren Molekülen, wie z. B. Oligodesoxynukleotiden oder Proteinen, können durch Messung der sog. Oberflächen-Plasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) in einem BIAcore-Instrument dargestellt werden. Die Messungen beruhen dabei auf folgendem physikalischen Phänomen: Strahlt man auf eine Metalloberfläche Licht, so tritt das Licht in Abhängigkeit von der Wellenlänge und dem Einfallswinkel des Lichts mit Oszillationen im Elektronengas des Metalls, den sog. Plasmonen, in Wechselwirkung. Diese Anregung der Oberflächenplasmonen nahe der Grenzfläche bewirkt ein detektierbares Minimum im Reflexionskoeffizienten. Dieser Effekt kann auch an einer Seite eines dünnen Metallfilms gemessen werden, an dessen anderer Seite sich eine für die Bindung von Analyten-Molekülen sensitive Schicht befindet. Durch die Änderung der elektrischen Eigenschaften der Schicht bei Einlagerung eines Analyten kommt es zu geänderten Bedingungen für die Plasmonresonanz. Damit ändert sich der Winkel, bei dem das Reflexionsminimum auftritt. Im BIAcore-Instrument stellt eine Goldfolie, die die Wand einer Durchflusszelle bildet (vgl. Abbildung 5), einen solchen Metallfilm dar. Auf der der Flusszelle zugewandten Seite der Goldfolie werden Liganden direkt oder indirekt an die Oberfläche der Goldfolie gekoppelt. Die Bindung von Analyten aus einer die Flusszelle durchströmenden

Lösung an die gekoppelten Liganden der Oberfläche bewirkt eine Änderung der Masse in der sensitiven Schicht der Goldfolie und damit eine Änderung der Oberflächen-Plasmonresonanz. Diese wird durch ein optisches System erfasst. Im BIAcore-Gerät wird dabei polarisiertes Licht einer bestimmten Wellenlänge in einem bestimmten Winkelspektrum auf einen Punkt der Goldoberfläche gestrahlt (*E* in Abbildung 5). Das fächerförmig reflektierte Licht wird mit einer optischen Detektionseinheit erfasst, die den durch die Oberflächen-Plasmonresonanz verursachten Schattenwinkel registriert.

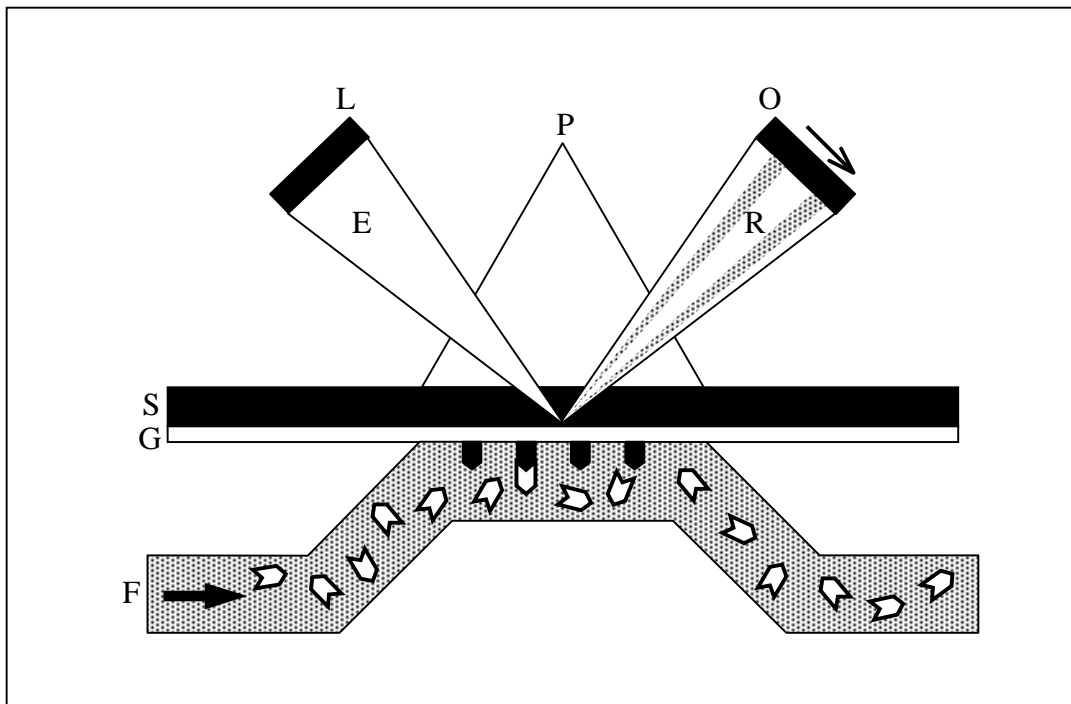


Abbildung 5: Schemazeichnung zur Messung der Oberflächen-Plasmonresonanz mit einem BIAcore-Instrument.

Der mit einem Goldfilm (G) überzogene Sensorchip (S) bildet die Wand einer Flusszelle (F). An dieser Stelle fällt auf die der Flusszelle abgewandten Seite der Goldfolie polarisiertes Licht einer Lichtquelle (L). Das fächerförmig durch ein Prisma (P) hindurch einfallende Licht (E) wird von der Oberfläche der Goldfolie reflektiert (R). Die Oberflächen-Plasmonresonanz verursacht eine Auslöschung des reflektierten Lichts in einer spezifischen Kombination von Lichtwellenlänge und Austrittswinkel. Der dadurch verursachte Schatten (hellgrau in R) wird von einer optischen Detektionseinheit (O) erfasst. Bindungsereignisse in der Flusszelle, die an der Oberfläche der Goldfolie stattfinden (schwarze Zeichen symbolisieren direkt an die Oberfläche der Goldfolie gekoppelte Liganden, weiße Zeichen symbolisieren gelöste Analyten; die Strömungsrichtung der Analytenlösung in der Flusszelle ist durch einen dicken Pfeil symbolisiert), führen zu einer Änderung im Brechungsindex der Goldfolie. Dadurch ändert sich auch die Oberflächen-Plasmonresonanz. Diese Änderung ist durch eine Änderung des Schattenwinkels im reflektierten Licht (symbolisiert durch einen dünnen Pfeil bei O) messbar (Abbildung nach Vorlage der Firma BIAcore AB, Uppsala, Schweden).

Die grafische Darstellung des Winkels des Intensitäts-Minimums im reflektierten Lichtstrahl gegen die Zeit bezeichnet man als *Sensorgramm*. Das BIAcore-Instrument misst

kontinuierlich die Position des Schattenwinkels und zeigt diesen unverzüglich im Sensorgramm an, so dass Bindungsereignisse an der Goldfolie, die eine Änderung dieses Winkels verursachen, direkt beobachtet werden können. Die für die Angabe der Position des Schattenwinkels verwendete Einheit im Sensorgramm ist die Resonanzeinheit (*resonance unit*, RU). Diese abgeleitete Einheit basiert auf dem direkten Zusammenhang zwischen einer Änderung der Massenkonzentration auf der sensitiven Goldoberfläche und der daraus resultierenden Änderung des Brechungsindex, die nahezu unabhängig von der Art der für die Massenänderung verwendeten Stoffe (Proteine, Peptide, Nukleinsäuren usw.) ist. Eine Änderung von 1000 RU entspricht dabei einer Änderung der Oberflächenkonzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ an der sensitiven Oberfläche der Goldfolie in der betrachteten Flusszelle.

Das BIAcore-Gerät besitzt vier Flusszellen, die abhängig oder unabhängig voneinander für Bindungsstudien verwendet werden können. Dies erlaubt die Eliminierung unspezifischer Effekte in der grafischen Darstellung des Sensorgramms. So kann beispielsweise ein Wechsel des verwendeten Puffers in den Durchflusszellen zu einer Änderung des Brechungsindex der Goldfolie führen, was sich durch die damit verbundene Änderung des Schattenwinkels (sog. *Puffersprung*) als scheinbares Bindungsereignis an der Goldfolie äußert. Da diese Änderung in allen Flusszellen gleich ist, läßt sich ein solcher unspezifischer Effekt durch Differenzbildung der für die einzelnen Flusszellen erhaltenen Werte eliminieren. Auf dem gleichen Prinzip beruht die Unterscheidung spezifischer und unspezifischer Bindungsereignisse der untersuchten Analyten mit den an die Goldfolie gekoppelten Liganden.

In dieser Arbeit werden Bindungsstudien von Proteinen des McrBC-Systems an immobilisierter, unterschiedlich modifizierter DNA unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Für die Experimente werden halbautomatische BIACORE-Instrumente des Typs 2000 (Fa. BIAcore, Uppsala, Schweden) verwendet, die von der Firma BIAcore AB (Freiburg) bzw. dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die dabei verwendete *Software* BIACORE Control 3.0 sowie BIAevaluation 3.0 stammt von der Firma BIAcore, ebenso wie die verwendeten Pufferlösungen (Typ HBS, bestehend aus 10 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA und 0.005 % (v/v) Surfactant P20; Typ HBS-EP, bestehend aus 10 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA und 0.005 % (v/v) Polysorbat 20; oder Typ TES, bestehend aus 10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA und 300 mM NaCl) und Sensorchips (Typ SA). Sensorchips vom Typ SA besitzen an der Goldoberfläche eine carboxymethylierte Dextranmatrix, an die Streptavidin kovalent gekoppelt ist. Dadurch ist eine Immobilisierung von Nukleinsäuren mit

einer 5'-Biotinylierung über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung möglich, wobei die Bindungskapazität des Chips pro Flusszelle > 1800 RU beträgt (Angabe für eine 30 bp lange, biotinylierte DNA). Die Vorbereitung der Sensorchips (Befehle *DOCKING*, *PRIME*) und die Immobilisierung biotinylierter Nukleinsäuren im Sensorchip erfolgen in dieser Arbeit nach der Betriebsvorschrift der Firma BIAcore. Pro Flusszelle werden 200 RU DNA, verdünnt in TES-Puffer, immobilisiert. Dieser Wert entspricht 200 pg DNA, gebunden an einer Oberfläche von 1 mm^2 . Die Flussgeschwindigkeit in den Messzellen beträgt 10 bzw. $20 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$, oder, zum Ausschluss von Massentransfer-Effekten, $100 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Als Waschlösung wird TES-Puffer, versetzt mit 0.02 % SDS, verwendet (jeweils 30 s, anschließend vierminütiges Spülen der Flusszellen mit dem jeweiligen für die Experimente vorgesehenen Puffer). Als Reaktions- und Verdünnungspuffer wird HBS oder HBS-EP verwendet, der bei Bedarf frisch mit MgCl_2 , BSA, GTP bzw. unspezifischer DNA (Poly[dI-dC] und Poly[dA-dT]) versetzt wird, so dass die Konzentrationen im Experiment 10 mM freies Mg^{2+} , $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ BSA, 1 mM GTP bzw. $2.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ unspezifische DNA betragen (das Gerät wird durch Ausführung des Befehls *PRIME* an einen geänderten Puffer angeglichen). Die Proteine des McrBC-Systems, GST- bzw. His₆-McrB, (GST-)N-Domäne (Aminosäurereste 1 bis 162) von McrB, GST- bzw. His₆-McrC, werden bis kurz vor ihrer Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, bei Bedarf auf die gewünschten Konzentrationen (min. 10 nM, max. 16 μM) verdünnt und bis zu ihrem Einsatz durch Eis gekühlt. Die Aufnahme der zwei- bis dreiminütigen Bindungs- und fünfminütigen Dissoziationskinetiken erfolgt bei Raumtemperatur unter Verwendung der Befehle *INJECT*, *KINJECT* oder *COINJECT*, wobei jeweils vor dem Pipettieren einer zu untersuchenden Lösung ein zusätzlicher Waschschrift der Pipettieradel (Befehl *EXTRACLEAN*) erfolgt.

Die Auswertung der aufgenommenen Sensorgramme unter Verwendung des Programms BIAevaluation 3.0 erfolgt gegen die Werte parallel aufgenommener Referenz-Sensorgramme. Diese resultieren aus identischer Behandlung zweier Flusszellen, von denen eine keine an die Oberfläche des SA-Chips gekoppelte DNA enthält, die andere eine Kopplung für das McrBC-System unspezifischer DNA aufweist. Die eigentlichen Messzellen sind mit diesen Referenzzellen in Reihe geschaltet, um identische Bedingungen zu gewährleisten. Die sich aus der Reihenschaltung der Flusszellen ergebenden zeitlichen Verzögerungen der Reaktionen werden bei der Auswertung berücksichtigt.

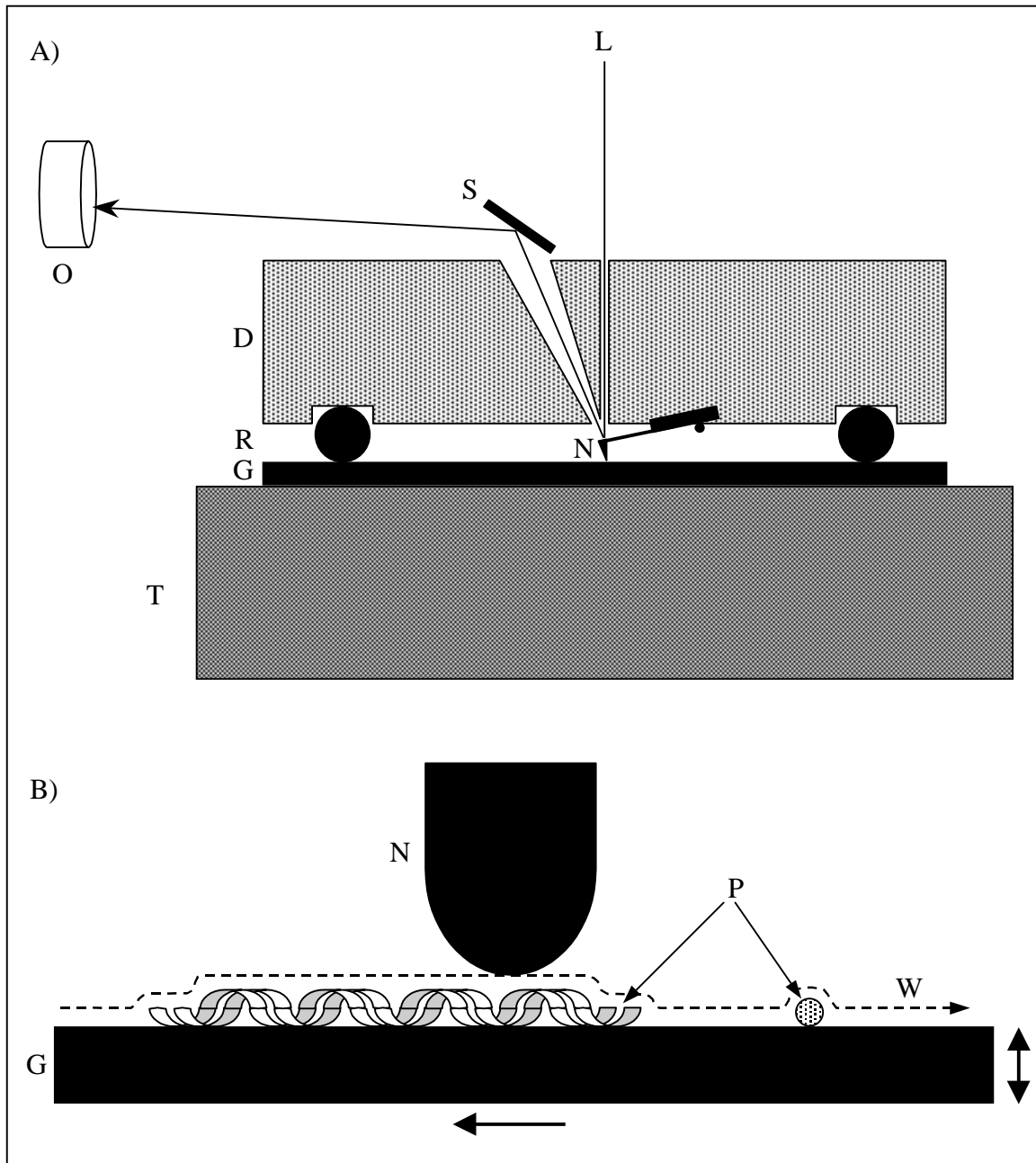


Abbildung 6: Schemazeichnung zur Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.

Die untere Abbildung *B* stellt einen vergrößerten Ausschnitt der oberen Zeichnung *A* dar.

Auf einem Träger (*T*) befindet sich eine Glimmerschicht (*G*), auf deren glatter Oberfläche die zu untersuchende Probe (*P*) aufgebracht wurde. Das Messfeld wird von einem O-Ring (*R*) und einem Deckel (*D*) abgeschlossen. Die Amplitude der schwingenden Nadel (*N*), die die Oberfläche des Messfeldes abtastet, wird mit Hilfe eines von der Nadel reflektierten LASER-Lichtstrahls (*L*, hier zusätzlich abgelenkt durch einen weiteren Spiegel, *S*) von einem optischen Sensor (*O*, eine Photodiode) gemessen. Durch vertikale Bewegung (symbolisiert durch einen Doppelpfeil in Abb. *B*, rechts) des piezoelektrisch positionierbaren Trägers (*T*) wird der Abstand der oszillierenden Nadel zum Untergrund konstant gehalten. Durch eine horizontale Bewegung des Trägers (symbolisiert durch einen Pfeil in Abb. *B*, unten) kommt es so zu einem Abtasten der Oberfläche in einer Bahn, wobei die Nadel relativ zum Untergrund einen Weg (*W*) zurücklegt, der dem Höhenprofil der Probe folgt. Durch aufeinanderfolgendes Abtasten parallel verlaufender Bahnen kann so das Höhenprofil des Messfeldes erstellt werden (Abbildung nach Vorlage von K. Rippe, Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Biophysik der Makromoleküle, Heidelberg).

3.4.3.c. Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie gestattet eine stark vergrößerte, auf der Abtastung eines Oberflächenreliefs basierende Abbildung von Makromolekülen auf ebenem Untergrund (Übersichtsartikel: Bustamante *et al.*, 1993; Hansma & Hoh, 1994; Bustamante *et al.*, 1994; Bustamante & Rivetti, 1996). Das dabei verwendete Rasterkraftmikroskop (*scanning force microscope*, SFM; auch bezeichnet als Atomkraftmikroskop, *atomic force microscope*, AFM) ist eine Weiterentwicklung des sog. Raster-Tunnelmikroskops (*scanning tunneling microscope*, STM) nach G. Binnig und G. Rohrer. Die grafische Darstellung resultiert aus einer Abtastung der Probenoberfläche in geringstem Abstand mit einer scharfen Spitze, die auf einem federnden Hebelarm (*cantilever*) angeordnet ist. Mit dem Rasterkraftmikroskop kann in einem die Probe stets oder intermittierend kontaktierenden oder in einem nicht kontaktierenden Modus gearbeitet werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten intermittierenden Betriebsmodus des SFM oszilliert die Mikroskopspitze mit einer größeren Amplitude als im Nicht-Kontakt-Modus, wobei die Amplitude der Schwingung mit Hilfe eines LASER-Strahls gemessen wird (vgl. Abbildung 6). In der Nähe der Probenoberfläche wird die Oszillation infolge der dort wirkenden Kräfte gedämpft und dadurch die Schwingungsamplitude der Spitze verkleinert. Die Spitze berührt die Probenoberfläche während der Messung pro Messpunkt vielmals leicht (sog. *tapping*-Modus). Dies erfolgt mit einem gegenüber dem Kontaktmodus wesentlich verringerten Energieumsatz, so dass auch gegen Beschädigungen anfällige Proben, wie biologische Materialien, untersucht werden können. Die dämpfungsbedingt erniedrigte Schwingungsamplitude wird über eine Rückkopplungselektronik durch einen piezoelektrisch bewegten Probenhalter konstant gehalten, so dass die mittlere z-Koordinate der Spitze der Proben topografie folgt.

In dieser Arbeit werden Aufnahmen mit einem SFM des Typs Nanoscope III (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) durchgeführt, das freundlicherweise von N. Mücke und J. Langowski (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Biophysik der Makromoleküle, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Die Oberfläche des verwendeten Glimmers (Fa. Plano GmbH, Wetzlar) wird kurz vor der Verwendung durch Abzug mit Hilfe von Klebeband geglättet und mit Reinstwasser gewaschen. Die Trocknung der Glimmeroberfläche erfolgt mit einem Strom filtrierte Stickstoffgases aus einer Druckflasche. Auf die so vorbereitete Oberfläche wird die Probe (geringes Volumen einer Lösung aufgereinigter DNA bzw. einer vorinkubierten DNA-Protein-Mischlösung) aufpipettiert und mit Hilfe von Stickstoffgas so angetrocknet, dass zwar eine Restfeuchtigkeit um die Probe verbleibt, aber keine tropfbar flüssige Lösung. Dabei vermittelt die Anwesenheit von Mg^{2+} (10 mM $MgCl_2$ in der

aufpipettierten Probenlösung) die Adhäsion der DNA an die Oberfläche des Glimmers. Die Abtastung des Oberflächenreliefs im *tapping*-Modus erfolgt mit einer aus Ätzung gewonnenen Siliziumnadel (Durchmesser der Spitze ca. 10 nm; Typ Nanosensor, Fa. L.O.T. Oriel, Darmstadt) mit einer konstanten Kraft von 17 bis 64 N·m⁻¹ und einer Schwingungsfrequenz von 250 bis 400 kHz.

3.4.4. DNA-Spaltung

Eine spezifische DNA-Spaltung durch eine Restriktionsendonuklease setzt voraus, dass die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristische Basensequenz (Erkennungssequenz) durch das Enzym von anderen (unspezifischen) Sequenzen der DNA unterschieden werden kann. Ein charakteristisches Merkmal der Restriktionsendonuklease McrBC ist die Abhängigkeit deren DNA-Spaltaktivität von dem Vorhandensein bestimmter Methylierungen an spezifischen Basen der DNA, wobei eine Initiation der DNA-Spaltung durch McrBC nach einer Erkennung der jeweiligen Methylierungen an den Basen der DNA erwartet werden kann, oder aber eine Unterdrückung einer sequenzabhängigen, intrinsischen Spaltaktivität bei Fehlen solcher Modifikationsstrukturen. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten zur Untersuchung der DNA-Spaltung durch das McrBC-System wird im Wesentlichen DNA mit 5-Methylmodifikation an definierten Cytosinresten verwendet, und die Abhängigkeit der DNA-Spaltung durch McrBC von der Anzahl, Verteilung, Lage und Orientierung der McrBC-Erkennungssequenzen in verschiedenen DNA-Molekülen analysiert.

Ein Spaltansatz in einem Volumen von 10 µl enthält DNA (z. B. 100 bis 200 ng Plasmid), McrB (2 bis 6 µM GST-McrB), McrC (0.5 bis 2 µM GST-McrC) und 1 bis 5 mM GTP in einem Puffer, bestehend aus 5 bis 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6 bis 7.9; 5 bis 10 mM MgCl₂; 5 bis 25 mM KCl, 1 bis 100 ng·µl⁻¹ BSA und 0.1 bis 0.5 mM DTT. Die genauen Konzentrationswerte hängen von der Zielsetzung des Experiments ab und können von den angegebenen Werten abweichen. Falls für das Experiment wesentlich, sind die jeweiligen Angaben an entsprechenden Stellen in dieser Arbeit vermerkt. Verschiedene Spaltansätze, deren Ergebnisse miteinander verglichen werden sollen, weichen nur in einer Variablen voneinander ab, beispielsweise im Methylierungsmuster der zu spaltenden DNA. Dies gilt auch für Spaltansätze, die der Kontrolle des Experimentes dienen. Ein Spaltansatz, der einer Kontrolle dient, darf *keine* bzw. *muss* eine bekannte DNA-Spaltung erzielen. Spaltansätzen, die der *negativen* Kontrolle dienen, fehlt GTP, McrB bzw. McrC, oder enthalten nichtmodifizierte DNA. *Positive* Kontrollen enthalten durch McrBC spaltbare DNA mit

bekanntem Fragmentierungsmuster in einem Ansatz mit McrB, McrC und GTP. In zeitlich parallelen Experimenten, deren Resultate miteinander verglichen werden sollen, werden Stoffe, die in den jeweiligen Ansätzen in gleichen Konzentrationen (oder in gleichem Konzentrationsverhältnis zueinander) vorliegen sollen, in einem gemeinsamen Ansatz vorgemischt und anschließend als Vormischung auf die einzelnen Ansätze verteilt. Dadurch wird der relative Fehler der Ansätze minimiert, was einen exakten Vergleich der Ergebnisse von parallel durchgeführten Experimenten erlaubt. Dieses Verfahren wird nicht angewendet, wenn es auf die Minimierung des absoluten Fehlers in der Einstellung der Konzentration eines bestimmten Stoffes ankommt. Wenn nicht anders angegeben, werden die Spaltansätze in folgender Reihenfolge pipettiert: Wasser, einzelne Pufferkomponenten (Puffersubstanz, KCl, MgCl₂, DTT, BSA) oder zehnfach konzentrierte Mischlösung der einzelnen Komponenten (10fach-Puffer), DNA, GTP, McrC, McrB. Die DNA-Hydrolysereaktion durch das McrBC-System wird also durch Zugabe von McrB gestartet. In einigen Experimenten wird aus praktischen Gründen die Reihenfolge insofern geändert, dass durch abschließende Zugabe der DNA (bei sonst gleicher Reihenfolge des Pipettierens) die Reaktion gestartet wird. Dies wird, sofern nicht für die Aussage des Experimentes wesentlich, nicht gesondert vermerkt. Nach jeder Zugabe einer Substanz in eine Lösung werden die Substanzen mit der verwendeten Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Lösung vermischt. bis zum Start der DNA-Spaltreaktion durch McrBC werden alle Zutaten der Reaktion bzw. die bereits vermischten Komponenten auf Eis gekühlt, wobei die verwendeten Proteine des McrBC-Systems nur so kurz wie möglich aus der Temperierung auf -20 °C genommen werden. Nach Zugabe der letzten Substanz (McrB bzw. DNA) wird die Lösung vorsichtig unter Verwendung eines *Vortex*-Vibrationsgerätes kurz vermischt. Mit dem Einsetzen des Reaktionsgefäßes in den entsprechend temperierten Heizblock (Typ Dri-Block DB-3, Fa. Techne Inc., Princeton, USA) beginnt die gemessene Inkubationszeit. Die DNA-Spaltung erfolgt bei 28, 37 oder, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C in einer maximalen Inkubationszeit von 90 min. Die einzuhaltenden Zeitwerte richten sich nach der jeweiligen Zielsetzung des Experimentes. Kinetiken werden durchgeführt, indem ein entsprechend großes Volumen des Spaltansatzes angesetzt wird, aus dem nach den gewünschten Inkubationszeiten ein definiertes Volumen (jeweils 10 µl) entnommen wird. Wenn nicht anders angegeben, unterscheiden sich die bei einer Kinetik genommenen Zeitwerte um den Faktor 2. Die Spaltungsreaktion durch McrBC wird gestoppt, indem ein entsprechendes Volumen Auftragspuffer (AAP, vgl. S. 57) in den Reaktionsansatz gegeben wird. Bei Kinetiken wird das für einen Zeitwert aus dem Reaktionsansatz entnommene Volumen in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem ein

entsprechendes Volumen des Auftragspuffers vorgelegt wird. Sowohl bei der Elektrophorese mit nativen Polyacrylamid-Gelen als auch bei Verwendung von Agarose-Gelen kann es vorkommen, dass die an Proteinkomplexe gebundene DNA nicht in das Gelsystem einwandert. Ein Zusatz von 0.2 % (w/v) SDS in die in das Gelsystem einzubringende Probe kann hier Abhilfe verschaffen. Soll die Analyse der DNA-Spaltung nicht durch Elektrophorese mit einem Agarose-Gel (vgl. S. 76) oder nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gel (vgl. S. 77), sondern mit einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (vgl. S. 80) erfolgen, wird die Spaltreaktion durch McrBC durch Zugabe einer 300 mM EDTA-Lösung (Endkonzentration 60 mM) gestoppt, durch Zugabe von Glykogen, Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (vgl. S. 87) und in 5 µl Formamid-EDTA aufgenommen (vgl. Kapitel *Denaturierende Polyacrylamid-Gele*, S. 80).

III. ERGEBNISSE

Das folgende Kapitel stellt die wesentlichen Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente vor. Da die Dokumentation von jedem einzelnen erzielten Ergebnis den Rahmen dieser Niederschrift sprengen würde, ist die gewählte Darstellung der Ergebnisse als eine Zusammenfassung der Resultate der experimentellen Arbeit zu verstehen.

1. Proteinaufreinigungen

Die Untersuchungen zur DNA-Spaltaktivität des GTP-abhängigen Restriktionssystems McrBC aus *Escherichia coli* K-12 sollten in dieser Arbeit *in vitro* unter Verwendung selbst aus Bakterien isolierter Untereinheiten der Restriktionsendonuklease erfolgen. Hierfür wurden in getrennten *E.-coli*-Bakterienstämmen, die keine Komponenten des McrBC-Systems besitzen (*E. coli* K-12, Derivat TC410 mit deletiertem *mcrBC*-Lokus; *E. coli* B, Derivat BL21), nach Transformation mit Expressionsvektoren, die eine induzierbare Überproduktion des gewünschten Proteins erlauben, die Untereinheiten McrB und McrC sowie Derivate von McrB als Fusionsproteine mit einer Affinitäts-Erweiterung, die eine chromatografische Aufreinigung erlaubt, getrennt voneinander exprimiert. Nach Anzucht der entsprechenden Bakterienstämme in Flüssigkulturen zu je 500 ml wurden die Zellen geerntet, gewaschen und das erhaltene Zellpellet in einem Puffer zum Zellaufschluss durch Ultraschall-Behandlung resuspendiert. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation aus der Lösung der aufgeschlossenen Zellen wurde der das gewünschte Protein enthaltende Überstand als Ausgangsmaterial für chromatografische Aufreinigungsschritte verwendet.

1.1. Induktion der Überexpression

Aufgereinigt wurden in dieser Arbeit GST-McrB aus *E. coli* TC410 (pBN211), GST-McrB_s aus *E. coli* TC410 (pGSTMcrBs), GST-McrC aus *E. coli* TC410 (pBN213), His₆-McrB aus *E. coli* BL21 (DE3, pLysS, pBBImcrB) sowie His₆-McrB_s aus *E. coli* TC410 (pHisMcrBs). Alle Expressionsvektoren boten die Möglichkeit einer IPTG-induzierten Überproduktion des jeweiligen Proteins, die bei Inkubationstemperaturen von 28 bis 30 °C die anteilmäßig stärkste Bildung an induziertem Protein in den Zellen ergaben. Eine Inkubationsdauer der

Zellkultur nach der Induktion der Proteinexpression von 4 h erwies sich dabei als ausreichend, längere Inkubationszeiten wirkten sich eher negativ auf die Qualität der gebildeten McrBC-Proteine aus. Ein Zusatz von Glucose ($6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in das Nährmedium der Bakterienkultur erbrachte keinen wesentlichen Vorteil hinsichtlich der Quantität und Qualität der exprimierten Proteine. Je Kulturvolumen von 500 ml wurden etwa 1.5 bis 1.9 g Zellmaterial als Ausgangsmaterial für eine Aufreinigung des jeweils induzierten Proteins gewonnen.

Die gelelektrophoretisch durchgeführte Kontrolle des Erfolges der IPTG-induzierten Überproduktion der Fusionsproteine ergab für die GST-Fusionsproteine aus pBN211, pBN213 und pGSTMcrBs sowie für die His₆-Variante von McrB_s aus pHisMcrBs eine ausreichend gute, für das His₆-Fusionsprotein aus pBBImcrB, His₆-McrB, sogar eine sehr gute Überexpression. Die GST-Fusionsproteine sowie His₆-McrB_s erschienen im Laemmli-Gel nach der Expressionsinduktion als zwar deutlich sichtbare Banden, diese waren aber nur etwas intensiver als die anderen Hauptbanden des Zell-Lysates ausgebildet. Im Vergleich dazu bildete das exprimierte His₆-McrB eine eindeutig dominierende Hauptbande im Laemmli-Gel. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall und der Abzentrifugation der bakteriellen Zelltrümmer aus der Lösung verblieben die GST-Fusionskonstrukte im Wesentlichen im Überstand, während die His₆-Varianten größtenteils pelletiert wurden. Bei Letzteren wurde aufgrund der großen Menge an exprimiertem Zielprotein auf eine Isolation der His₆-Fusionsproteine aus dem Pellet verzichtet und ausschließlich eine Aufreinigung der im Überstand verbliebenen Proteine durchgeführt. Auf eine Optimierung der Zentrifugationsbedingungen nach erfolgtem Zellaufschluss zugunsten eines größeren Anteils an löslichem Protein wurde verzichtet, da aus der im Überstand vorhandenen Menge an Protein ausreichend viel gewünschtes Material aufgereinigt werden konnte.

1.2. Affinitäts-Chromatografie

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen Versuche zur Untersuchung der DNA-Spaltung der McrBC-Restriktionsendonuklease mit McrB- und McrC-Proteinen durchgeführt, die N-terminal eine Erweiterung ihrer Primärstruktur um die Glutathion-Bindedomäne der Glutathion-S-Transferase (GST) besitzen. Diese Fusionsproteine wurden daher in großem Maßstab mit Hilfe der Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie aus *E. coli* TC410 (pBN211) bzw. TC410 (pBN213) aufgereinigt. Insbesondere die erfolgreiche Aufreinigung von GST-McrB machte dabei zunächst erhebliche Schwierigkeiten, da zu einem die Ausbeute an erhaltenem McrB-Protein sehr gering war, zum zweiten das Protein durch längere

Aufarbeitungszeiten sehr schnell an Aktivität einbußte, und zum dritten zunächst keine als sehr sauber zu bezeichnende Proteinpräparation erhalten wurde. Abgesehen von der gelelektrophoretisch nachweisbaren Kontamination der Präparation von GST-McrB mit Proteinen anderer Größe, die zum Teil als sehr deutliche Banden im Laemmli-Gel zu erkennen waren, enthielten die ersten Präparate von GST-McrB eine bei der Untersuchung der DNA-Spaltung durch McrBC auffällige, leichte Verunreinigung durch unspezifische Nukleasen. Da das McrBC-Restriktionssystem nur in bestimmter Art modifizierte DNA schneidet und dazu die Anwesenheit beider Untereinheiten (McrB und McrC) sowie die von GTP notwendig ist, lassen sich Kontaminationen der Proteinpräparate (und auch von DNA-Präparationen und Pufferkomponenten) mit anderen Nukleasen relativ leicht nachweisen. Um eine verbesserte Reinheit von GST-McrB zu erhalten und insbesondere um Verunreinigungen durch unspezifische Nukleasen in der Präparation zu eliminieren, wurde zusätzlich zu der Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose-Matrix als ergänzender Aufreinigungsschritt eine Anionenaustausch-Chromatografie mit DEAE-Zellulose als Matrix versucht (s. S. 73). Da die zusätzliche Aufreinigung mit Anionenaustausch-Chromatografie mit großem Materialverlust von GST-McrB einherging (vgl. S. 118), wurden diese Versuche zugunsten einer Verbesserung der Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose eingestellt.

Die Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie erbrachte nach einigen Optimierungsversuchen sehr brauchbare GST-McrB Präparate, die zwar nur eine nach Gelelektrophorese abgeschätzte Reinheit von $< 80\%$ besaßen, jedoch keine störende Verunreinigung durch unspezifische Nukleasen enthielten. Als entscheidend für eine erfolgreiche Präparation von GST-McrB erwies sich die Verwendung ausreichender Mengen Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose) sowie eine gute Angleichung von pH-Wert und Ionenstärke des Äquilibrierungspuffers der Affinitätsmatrix an jene Werte des proteinhaltigen Überstandes der Zentrifugation des Zellaufschlusses. Zusätzlich sollte die Aufreinigung von GST-McrB sehr zügig und unter guter Kühlung erfolgen, um Aktivitätsverluste zu vermeiden. Pro Gramm Zellmaterial konnten auf diese Weise > 1 mg GST-McrB aufgereinigt werden. Da die mit diesen Präparationen vorgesehenen Experimente einen sehr hohen Materialverbrauch an McrB (und McrC) haben und eine konstante Qualität der Proteinpräparationen gewährleistet sein sollte, wurden für eine Proteinaufreinigung von GST-McrB jedesmal mindestens 2 l Bakterienkultur angesetzt (gleiches gilt auch für GST-McrC). Für Aufreinigungen von GST-McrC mit der Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie hat sich eine Elution mit höherer Konzentration an reduziertem Glutathion im Elutionspuffer (bis 100 mM GSH in HED/Gly-

Puffer) als sinnvoll erwiesen, um die Ausbeute zu erhöhen. Pro Gramm Zellmaterial konnte trotzdem keine höhere Ausbeute an GST-McrC als 0.3 mg erzielt werden.

Die Aktivität der erhaltenen GST-McrB-Präparation wurde von U. Pieper durch Überprüfung des GTP-Bindungsvermögens der aufgereinigten Proteine mit Hilfe des Nitrozellulosefilter-Bindungstests (Pieper *et al.*, 1997) bestimmt und ergab einen Anteil von bindungsaktivem GST-McrB in den Proteinpräparationen von max. 50 %. Inwiefern GST-McrB, das hinsichtlich der GTP-Bindung in inaktiver Form vorliegt, auch DNA-Bindungseigenschaften oder die Fähigkeit einer erfolgreichen Beteiligung an dem Aufbau DNA-spaltaktiver McrBC-Komplexe verloren hat, kann nicht ohne weiteres gesagt werden.

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) erwiesen sich für die Messung der erhaltenen Konzentrationsbereiche der Proteinpräparationen Verdünnungen der Proteinaufarbeitung um den Faktor 10^{-3} bis $4 \cdot 10^{-3}$ als geeignet. Als Referenzkonzentrationen wurden zur Aufnahme der Eichkurve 0, 1, 2, 4, 6 und 8 μg BSA in den Test eingesetzt. Die bei den Aufreinigungen von GST-McrB und GST-McrC erhaltenen Konzentrationen lagen im mikromolaren Bereich (Größenordnung 10^{-5} bis 10^{-4} M) und waren in sehr starkem Maße davon abhängig, bis zu welchem Restvolumen die Einengung der proteinhaltigen Eluatfraktionen durch den verwendeten *Centricon*-Konzentrator vorangetrieben wurde. Je nach Bauart des Konzentrators (die Firma Amicon *Inc.* bietet die sich in ihrer Ausschlussgrenze der Filtermembran unterscheidenden Geräte in unterschiedlichen Größen an, die verschiedene Restvolumina der Proteinlösung erhalten) und Dauer sowie Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifugation können die Proteinlösungen von schwach bis sehr stark aufkonzentriert werden. Aber selbst bei höheren Konzentrationen (GST-McrB_s: > 650 μM) blieben die GST-Fusionsproteine in Lösung. Die Proteinaufarbeitungen wurden mit Glycerin versetzt, so dass die Glycerinkonzentration der Lösung 50 % (v/v) Glycerin betrug. Dadurch wurde ein Einfrieren der Lösung bei der Lagerungstemperatur von -20°C verhindert, was, wie festgestellt wurde, die Aktivität insbesondere der McrB-Präparationen bei mehrmaligem Auftauen stark schädigt.

Bei den Aufreinigungen der McrB_s-Varianten aus Zellen von *E. coli* TC410, die den Expressionsvektor pHisMcrBs (für His₆-McrB_s) bzw. pGSTMcrBs (für GST-McrB_s) enthielten, konnten pro Gramm Zellmaterial 0.05 mg His-McrB_s bzw. 1.6 mg GST-McrB_s mit zufriedenstellender Reinheit isoliert werden.

Das Expressionssystem des His₆-Fusionsproteins His₆-McrB, *E. coli* BL21(DE3, pLysS, pBBImcrB), ergab eine im Vergleich zu den GST-fusionierten Formen deutlich stärkere Expression der His₆-Proteine. So konnten aus diesen Stämmen die Proteine mit deutlich

höherer Ausbeute isoliert werden (His₆-McrB: > 10 mg pro Gramm Zellmaterial bei zufriedenstellender Reinheit), obwohl das Protein beim Auftrag des Zellaufschlusses auf die Chromatografie-Säule nur unvollständig an das Säulenmaterial band und es bei den Waschschritten zu großen Verlusten kam. Die bei den Aufreinigungen erhaltenen Konzentrationen der His₆-modifizierten Proteine sind dabei so hoch, dass sich bei der Lagerung der Proteinpräparationen bei -20 °C eine weißliche Trübung in der durch den Gehalt von 50 % (v/v) Glycerin bei dieser Temperatur noch flüssigen Lösung bildet. Diese Trübung fällt bei längerer Lagerung als weißer Niederschlag aus und lagert sich am Boden des Gefäßes (1.5-ml-Reaktionsgefäß) ab. Interessanterweise löst sich dieser Niederschlag bei einer Erwärmung auf eine Temperatur von 0 °C wieder auf, bis keine Trübung der Lösung mehr festzustellen ist. Das Auftreten der Trübung bei -20 °C ist schon bei einer Konzentration an His₆-McrB von 20 µM festzustellen und wird mit steigender Proteinkonzentration zunehmend stärker. Die hier erhaltenen His₆-McrB-Präparationen hatten zum Teil Konzentrationen > 100 µM, durch die ein sehr starkes Ausfallen des His₆-McrB bei der Lagerung bei -20 °C erfolgte. Derartige His₆-Proteinpräparationen wurden auf Proteinkonzentrationen von < 20 µM verdünnt, um das Ausfallen der Proteine zu verhindern.

1.3. Anionenaustausch-Chromatografie

Nach den ersten Versuchen der Aufreinigung von GST-McrB mit Hilfe von Glutathion-Sepharose in einer Affinitäts-Chromatografie zeigte sich in den erhaltenen Präparationen neben der gewünschten Aktivität von McrB auch eine leichte Aktivität unspezifischer Nukleasen. Um diese Kontaminationen aus den Proteinpräparationen zu entfernen und so eine verbesserte Reinheit der Proteinisolate zu erzielen, wurde im Rahmen der Proteinaufreinigung eine zweite Chromatografie durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Anionenaustausch-Chromatografie mit Diethylaminoethyl-Zellulose (DEAE-Zellulose) als Matrix. Diese Art der Chromatografie hatte sich zu diesem Zweck in zahlreichen anderen Proteinaufarbeitungen bewährt (Hahn, 1991) und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Eignung als ein der Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie vor- bzw. nachgeschalteter Reinigungsschritt untersucht.

In Vorversuchen hierzu wurde das Bindungsverhalten von bereits mit Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie gereinigtem GST-McrB an die DEAE-Zellulosematrix in verschiedenen Puffersystemen untersucht. Hierzu wurden als kleine Chromatographiesäulen Pasteur-Pipetten aus Glas verwendet, die mit ihrer Spitze nach unten senkrecht fixiert und mit

etwas leicht gestopfter Glaswolle in der ausgezogenen Spitze abgedichtet wurden. Die Glaswolle hat die Funktion eines Filters, der eine 1 bis 2 cm hoch aufgebraute DE52-Matrix (vorgequollene DEAE-Zellulose der Fa. Whatman) in dem so hergestellten Säulchen hält, aber einen Flüssigkeitsdurchstrom gewährleistet. Für die Äquilibrierung der DE52-Matrix und zum Auftragen der Proteine auf die Säule wurden Phosphatpuffer (30 mM Kaliumphosphat, pH 7.2; 20 mM Imidazol; 0.1 mM DTE; 0.01 % [w/v] Lubrol) sowie HEPES-Puffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 1 mM DTT oder DTE; 1 mM EDTA) mit Zusatz unterschiedlicher Salzkonzentrationen (0 bis 500 mM NaCl bzw. KCl) verwendet, denen mit unter 0.5 mM GDP und/oder 2 mM MgCl₂ zugesetzt wurden. Die Elution geschah mit grobstufigen NaCl-Gradienten (0 bis 1 mM NaCl im Äquilibrierungspuffer) mit jeweils dem Auftrag entsprechenden Volumen.

Die Vorversuche mit jeweils 1 ml Auftragsvolumen, das Puffer mit Zusatz von 1.5 µM GST-McrB enthielt, zeigten eine schwache Bindung von GST-McrB an die DEAE-Zellulose in Abwesenheit zusätzlicher Salze sowie in Anwesenheit geringer Konzentrationen von NaCl oder KCl ($c \leq 100$ mM). Dieses Verhalten stimmt in der Beobachtung von Hahn (1991) überein. Trotz Vergrößerung des DE52-Volumens konnte jedoch keine vollständige Bindung von GST-McrB an die DEAE-Zellulose erzielt werden, das Protein war stets im Durchlauf des Auftrags nachweisbar (Kontrollen aller Schritte durch TCA-Fällung der durchgelaufenen Proteinfractionen und Analyse über SDS-PAGE). Bei höherer Ionenstärke verlieren die Proteine zunehmend die Bindungseigenschaften an die Matrix.

Resultierend aus den Ergebnissen der Vorversuche wurde eine Aufreinigung von GST-McrB im präparativen Maßstab unter Verwendung der Anionenaustausch-Chromatografie als Ergänzung zur Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatografie vorgenommen. Ausgangsmaterial waren hierfür Zellen von *E. coli* TC410 (pBN211), die eine starke GST-McrB Expression nach Induktion durch IPTG aufwiesen. Die nachstehend beschriebene DEAE-Zellulose-Chromatografie wurde einerseits vor, andererseits nach der oben beschriebenen Affinitäts-Chromatografie durchgeführt. Für ein Feuchtgewicht des Zellpellets von 3.5 g wurden 40 ml HED-Puffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 1 mM EDTA), versetzt mit 0.2 mM GDP, 2 mM MgCl₂ und 10 % (v/v) Glycerin, zum Aufschluss der Zellen verwendet bzw. ein zuvor über Glutathion-Sepharose gereinigtes Proteinkonzentrat in diesem Puffer mit einem Endvolumen von 40 ml aufgenommen. Die Lösung (bzw. bei einer beginnenden Anionenaustausch-Chromatografie der Überstand nach Abzentrifugation der Zelltrümmer aus dem Zellaufschluss) wurde auf eine Durchflusssäule (Säulendurchmesser: 2.5 cm) mit 7.5 ml Trägermatrix DE52 gegeben, die zuvor mit Auftragspuffer

(Aufschlusspuffer) äquilibriert wurde. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Stufengradienten (0 bis 800 mM NaCl in oben genanntem Puffer) von der Säule eluiert, wobei schon geringe Salzkonzentrationen (100 mM NaCl) das GST-McrB fast vollständig von der Säule lösten.

Die gelelektrophoretische Analyse der präparativen Aufreinigung zeigt, dass durch eine Anionenaustausch-Chromatografie unter Verwendung von DEAE-Zellulose eine leichte Verbesserung der Reinheit der GST-McrB-Präparation erzielt werden kann, die jedoch mit unrentabel großen Verlusten an diesem Protein einhergeht. Dies gilt sowohl für die Durchführung einer Anionenaustausch-Chromatografie vor als auch nach einer Proteinaufreinigung durch Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose, die eine wesentlich bessere Anreicherung von GST-McrB ermöglicht. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit bei der Präparation der GST-Fusionsproteine auf eine Anionenaustausch-Chromatografie verzichtet und stattdessen die Affinitäts-Chromatografie mit Glutathion-Sepharose als Matrix verbessert und als einziger Aufreinigungsschritt etabliert.

2. Thermischer Einfluss auf die Proteinstabilität

Isolierte Proteine sind nicht dauerhaft haltbar. Die für die kurz- und langfristige Lagerung der Proteine verwendeten Temperaturen haben neben dem Alter der Proteinpräparation und den Milieubedingungen in der proteinhaltigen Lösung großen Einfluss auf den Grad der Degradierung und der Denaturierung des isolierten Proteins. Dabei besitzen verschiedene Proteine eine unterschiedliche Stabilität. Eines der Untersuchungsobjekte der vorliegenden Arbeit, die Untereinheit McrB des Restriktionssystems McrBC, ist ein im Vergleich mit anderen Proteinen sehr labiles Protein. In dieser Arbeit wurde in diesem Zusammenhang der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des hier aufgereinigten GST-McrB-Fusionsproteins untersucht. Der als Maß für die Stabilität des Proteins betrachtete Parameter ist dabei die Fähigkeit von McrB, an spezifisch modifizierte DNA zu binden. Die spezifische DNA-Bindung geschieht, wie zu Beginn dieser Arbeit gezeigt wurde (Gast *et al.*, 1997), durch den aminoterminalen Abschnitt von McrB. Die Temperaturstabilität von McrB bezüglich der Fähigkeit zur DNA-Bindung wurde daher in der vorliegenden Arbeit mit der entsprechenden Stabilität der isolierten DNA-Bindungsdomäne von McrB (sog. *N-Domäne von McrB* oder *McrB₁₋₁₇₀*, bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 170) verglichen. McrB₁₋₁₇₀ wurde,

ebenfalls als GST-Fusionsprotein, von U. Pieper (Gießen) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

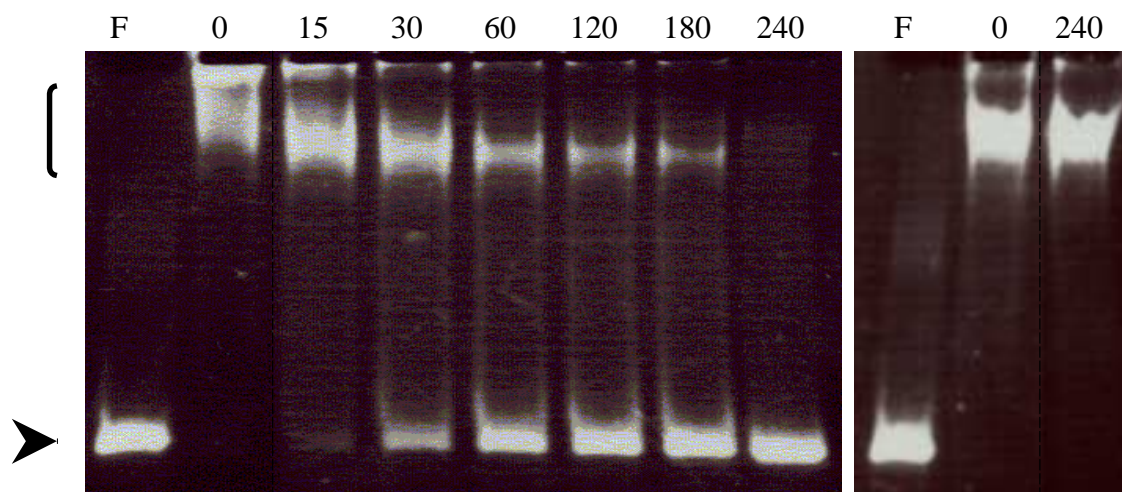


Abbildung 7: Einfluss der Inkubation von McrB und McrB₁₋₁₇₀ bei 37 °C auf das DNA-Bindungsvermögen der Proteine.

Die Abbildung zeigt zwei ethidiumbromidgefärbte *mobility-shift* Gele (6 % PAA), die DNA-Bindung durch GST-McrB (linkes Gel) bzw. GST-McrB₁₋₁₇₀ (rechtes Gel) dokumentieren. Der Pfeilkopf zeigt die Lage der freien DNA im Gel (Sb61-11.11, s. S. 134), die Klammer die Lage der DNA-Protein-Komplexe (spez. *shift*-Bande; die Komplexe sind zum Teil nicht vollständig in das Gel eingewandert und befinden sich daher teilweise auch am Boden der Auftragstaschen, sichtbar am oberen Bildrand). In der mit *F* bezeichneten Gelbahn ist nur DNA, in den mit Zahlen bezeichneten Bahnen sind DNA-Protein-Bindungsansätze aufgetragen, wobei alle Bindungsansätze bei identischen Konzentrationen an McrB bzw. McrB₁₋₁₇₀ (jeweils 1 μ M) und DNA (jeweils 0.5 μ M) zuvor für 20 min auf Eis inkubiert wurden (vgl. S. 103). Die über den Gelfotos stehenden Zahlen geben Auskunft über die Inkubationszeit des jeweiligen Proteins (Angabe in Minuten) bei einer Temperatur von 37 °C, bevor dieses in den Bindungsansatz eingesetzt wurde.

Durch Anwendung der *mobility-shift* Methode (vgl. S. 104) konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Inkubationszeiten und -temperaturen auf beide Proteine unterschiedlich auswirken. Während die N-terminale Domäne McrB₁₋₁₇₀ nach bis zu vierstündigen Inkubationen bei 0, 25 und 37 °C keinerlei Einbußen im DNA-Bindungsvermögen zeigte (vgl. Abbildung 7, rechts), verlor das McrB-Protein voller Länge die Fähigkeit zur DNA-Bindung mit steigender Inkubationstemperatur und -zeit zum Teil schon innerhalb des untersuchten Inkubationszeitraumes von vier Stunden. Zwar läßt sich auch für McrB weder bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C noch bei 25 °C innerhalb einer Inkubationszeit von vier Stunden eine Abnahme des DNA-Bindungsvermögens nachweisen, jedoch bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C (Abbildung 7, links). Schon eine 15minütige Inkubation von GST-McrB bei 37 °C reduziert das DNA-Bindungsvermögen von McrB messbar, nach

einer einstündigen Inkubation bei dieser Temperatur hat bereits über die Hälfte der McrB-Proteine die DNA-Bindungseigenschaften verloren. Nach einer vierstündigen Inkubation von McrB bei 37 °C ist eine DNA-Bindung durch das so behandelte Protein nicht mehr nachweisbar. Das Phänomen, dass die Fähigkeit zur spezifischen DNA-Bindung in der isolierten aminoterminalen Domäne von McrB thermisch wesentlich stabiler ist als die des kompletten McrB-Proteins, wird später diskutiert (vgl. Kapitel *Diskussion*).

In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine entsprechende Überprüfung der Stabilität des McrC-Proteins durchgeführt. Aufgrund mangelnder DNA-Bindungseigenschaften von McrC (vgl. Kapitel *Einleitung* sowie unten gezeigte Ergebnisse der hier durchgeführten Studien zur DNA-Bindung) wurde als Kontrollparameter für die Stabilitätsüberprüfung die Notwendigkeit von McrC ausgewählt, an spezifischen DNA-Spaltungen durch McrBC-Komplexe beteiligt zu sein. Hier zeigte sich, dass 200 ng Plasmid-DNA (durch *M.Bsu*FI methyliertes pBW201) durch 2 µM McrB und 8 µM McrC bei Anwesenheit von 1 mM GTP fragmentiert werden, und zwar qualitativ und quantitativ unabhängig davon, ob das im Spaltansatz verwendete McrC (als GTS-Fusionsprotein) drei Stunden bei 37 °C vorinkubiert wurde oder nicht. Auch eine Vorinkubation von McrC für zwei Stunden bei 42 °C zeigte keinen Effekt auf die Spaltaktivität der hieraus gebildeten McrBC-Komplexe. Erst eine einstündige Vorinkubation von McrC (20 µM) bei 55 °C inaktiviert die McrBC-Komplexe, die das vorinkubierte McrC enthalten, bezüglich der DNA-Spaltung.

Die Anwesenheit von GTP spielt hinsichtlich der Temperaturstabilität von McrC keine Rolle. Dies steht im Gegensatz zu der Situation bei McrB. Die oben beschriebene Abhängigkeit der DNA-Bindung durch McrB von der Inkubationzeit bei einer Temperatur von 37 °C entspricht den Ergebnissen bezüglich der Untersuchung des Einflusses dieser Vorinkubation von McrB in Hinsicht auf das Vermögen des vorinkubierten McrB-Proteins, DNA-spaltaktive Komplexe aufzubauen. In analog zu der oben beschriebenen Untersuchung der temperaturabhängigen Stabilität von McrC durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass McrBC-Komplexe, die halbstündig bei 37 °C vorinkubierte McrB-Untereinheiten enthalten (4 µM GST-McrB), lediglich residuelle DNA-Spaltung durchzuführen vermögen. Die Anwesenheit von 1 mM GTP im Vorinkubationsansatz stabilisiert das bei 37 °C vorinkubierte McrB deutlich: McrBC-Komplexe, die derart vorinkubiertes McrB enthalten, sind zu etwa 90 % aktiv bezüglich DNA-Spaltung wie McrBC, dessen Untereinheiten nicht vorinkubiert wurden. Auch die Anwesenheit von 5 µM McrC, nicht aber die Anwesenheit gleicher Menge BSA stabilisiert das bei 37 °C vorinkubierte McrB-Protein: McrBC-Komplexe, die sich aus zusammen halbstündig bei 37 °C vorinkubierten McrB- und

McrC-Untereinheiten bilden, besitzen noch 50 % der DNA-Spaltaktivität nicht vorinkubierter Komplexe. Die Anwesenheit von 1 mM GTP läßt gemeinsam vorinkubierte McrB- und McrC-Untereinheiten eine halbstündige Vorinkubation bei 37 °C unbeschadet überstehen: Nach Zusatz von spezifischer DNA zeigen diese Komplexe noch volle DNA-Spaltaktivität.

3. Herstellung der DNA-Substrate

Die *in-vitro*-Untersuchung der DNA-Bindung und -Spaltung durch das GTP-abhängige Restriktionssystem McrBC aus *E. coli* K-12 erfordert den Einsatz verschiedener Substrat-DNA. Die zu verwendenden DNA-Moleküle sollten sich in ihrer Größe und in der Art, Anzahl, Lage, Verteilung und Orientierung von Erkennungssequenzen für das McrBC-System unterscheiden. Eine Erkennungssequenz von McrBC setzt sich aus einem 5'-stehenden, variablen Purinrest (R, mögliche Basen: Adenin oder Guanin) und einem 3'-stehenden, variabel modifizierten Cytosinrest (^mC, mögliche Modifikationen: 5-Methylierung, 5-Hydroxymethylierung und N⁴-Methylierung) zusammen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Substrate mit 5-Methylcytosin-Modifikationen (M) verwendet, die in beiden möglichen Arten von McrBC-Erkennungssequenzen vorkommen: 5'-AM-3' und 5'-GM-3', wobei letztere Form überwiegend eingesetzt wurde.

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate wurden vor ihrem Einsatz in einem Experiment *in vitro* mit geeigneten Methylierungen an Cytosinresten modifiziert, sofern keine entsprechende Modifikation durch *in-vivo*-Systeme vorhanden oder über entsprechend modifizierte *primer* bei einer Herstellung der Substrate durch PCR eingeführt wurde. Sämtliche DNA-Substrate wurden in einer aufgereinigten Form in die Untersuchungen eingesetzt, die die jeweiligen experimentellen Anforderungen erfüllt. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate wurden mit Ausnahme der in der Einleitung erwähnten Plasmide (vgl. Kapitel *Substratplasmide*, S. 45) und synthetischen DNA-Einzelstränge (vgl. Kapitel *Oligodesoxynukleotide*, S. 48) selbst generiert (Plasmide pBW201W, pMcrSb1, pMcrSb2 und pMcrSb3, sämtliche Plasmidfragmente, PCR-Produkte und doppelsträngige Oligodesoxynukleotide). Die Ergebnisse dieser Herstellungen sind im Folgenden beschrieben.

3.1. Plasmide

Das Restriktionssystem McrBC ist in der Lage, spezifisch methylierte DNA zu spalten. Als Substrat für die Untersuchung der DNA-Spaltaktivität bieten sich daher *in vivo* durch

geeignete DNA-Methyltransferasen modifizierte Plasmide an. In dieser Arbeit wurde das *in vivo* durch die m^5C -Methyltransferase *M.BsuFI* methylierte Plasmid pBW201 (vgl. S. 45 und S. 282) als Standard-Plasmidsubstrat für Experimente mit dem McrBC-System verwendet. Für weitergehende Untersuchungen wurde das Plasmid in verschiedener Weise in seiner Sequenz verändert, um das Methylierungsmuster und die daraus resultierenden Erkennungssequenzen von McrBC, sowie deren Abstände zueinander zu variieren. So wurden, basierend auf pBW201, die Substratplasmide pBW201W und pMcrSb1 generiert. Das Plasmid pMcrSb1 wiederum war Ausgangsmaterial für die Herstellung der Substratplasmide pMcrSb2 und pMcrSb3. Die Herstellung der Substratplasmide ist in den folgenden Kapiteln dokumentiert.

3.1.1. pBW201W

Das 4914 bp große Plasmid pBW201W wurde in dieser Arbeit als Substratplasmid für das McrBC-Restriktionssystem generiert. Es ist ein direktes Derivat des Plasmids pBW201 (vgl. S. 45 und S. 282) und trägt in dessen einziger Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *EcoRI* die Sequenz des unten beschriebenen Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 (vgl. S. 134). Analog zu seinem Ursprung pBW201 wird durch pBW201W *in vivo* die Methyltransferase *M.BsuFI* konstitutiv exprimiert, die durch die Oligodesoxynukleotid-Insertion in pBW201W zwei Erkennungssequenzen (5'-CCGG-3') mehr als in pBW201 findet und zu 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin) methyliert.

Zur Herstellung von pBW201W wurde zur Gewinnung der Ausgangsmaterialien zum Einen das Plasmid pBW201 aus einer Flüssigkultur des Bakterienstammes *Escherichia coli* TC410 (pBW201) präpariert (vgl. S. 45) und durch das Restriktionsenzym *EcoRI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓AATTC-3') linearisiert (vgl. S. 93), zum Anderen das Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 durch Hybridisierung seiner synthetisch hergestellten DNA-Einzelstränge gewonnen (vgl. S. 134). Das Oligodesoxynukleotid wurde unter Ausnutzung seiner *EcoRI*-kompatiblen Enden ohne Phosphorylierung seiner 5'-ständigen Hydroxylgruppen in das *EcoRI*-linearisierte Plasmid pBW201 einligiert (vgl. S. 95). Das Produkt der Ligationsreaktion wurde ohne weitere Aufreinigung in kalziumkompetente Zellen (vgl. S. 63) des *mcrBC*-negativen Stammes *E. coli* TC410 (s. S. 39) eingebracht (vgl. S. 99). Der Nachweis der erfolgreichen Insertion von Sb61-11.11 in die *EcoRI*-Schnittstelle von pBW201 erfolgte über analytische Restriktionsspaltung erhaltener Plasmide (vgl. S. 93), die aus Flüssigkulturen einiger aus der Transformation gewonnener Klone präpariert wurden, mit

der Restriktionsendonuklease *EcoRV*. Das Ausgangsplasmid pBW201 besitzt keine spezifische Schnittstelle für das *EcoRV*-Restriktionsenzym (*EcoRV* erkennt und schneidet die Sequenz 5'-GAT↓ATC-3'), während pBW201W eine singuläre Schnittstelle für *EcoRV* in der Sequenz des Inserts Sb61-11.11 enthält. Somit erzielt ein Restriktionsverdau von pBW201 mit der Endonuklease *EcoRV* keine Veränderung an dem Plasmid, während pBW201W durch das Enzym linearisiert wird. Die gelanalytische Kontrolle (vgl. S. 76) des Restriktionsverdaus zeigte, dass drei von elf überprüften Klonen das gewünschte Plasmid pBW201W enthalten. Für die weitere Arbeit wurde lediglich einer dieser erhaltenen Klone für Plasmidpräparationen verwendet.

Durch die identischen Enden des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 kann diese DNA in zweierlei möglichen Orientierungen in eine *EcoRI*-Schnittstelle einligiert werden. In welcher Orientierung sich das Oligodesoxynukleotid in den erhaltenen Plasmiden pBW201W befindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft, da dies für die vorgesehenen Experimente mit pBW201W keine Rolle spielt. Eine Sequenzierung von pBW201W wäre jedoch mit den in dieser Arbeit verwendeten PCR-*primern* Sb1Hin und 201-2r (vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49) möglich.

3.1.2. pMcrSb1

Das zweite in dieser Arbeit hergestellte Substratplasmid für das McrBC-Restriktionssystem, das 5129 bp große pMcrSb1, ist wie pBW201W ebenfalls ein direktes Derivat des Plasmids pBW201. Im Gegensatz zu pBW201W (siehe vorheriges Kapitel) resultiert pMcrSb1 nicht lediglich aus einer Insertion in pBW201, sondern ist ein Fusionsprodukt eines Teils von pBW201 (vgl. S. 45) mit einer Sequenz aus einer anderen zirkulären DNA, dem Plasmid pBW5 (vgl. S. 47). Aus seinem Ursprung pBW201 stammt die Fähigkeit von pMcrSb1, die DNA-Methyltransferase *M.BsuFI* *in vivo* konstitutiv exprimieren zu lassen, was eine C5-Methylierung des jeweils ersten Cytosinrests der *M.BsuFI*-Erkennungssequenzen (5'-CCGG-3') bewirkt.

Hintergrund für die Generierung von pMcrSb1 war die im Verlauf der Untersuchung der DNA-Spaltung durch die Restriktionsendonuklease McrBC entstandene Forderung nach einem langen Abschnitt in einer Plasmidsequenz, der durch die Methylase *M.BsuFI* nicht methyliert wird (s. S. 183). In pBW201 ist der längste methylierungsfreie Bereich das Gen der Methyltransferase, *hsrFI*, und dessen unmittelbare Umgebung (vgl. Abbildung 4 auf S. 46). Dieser sich über einen etwa 2.9 kbp erstreckende Bereich, der auch nach der Methylierung

durch *M.BsuFI* frei von Erkennungssequenzen für das Restriktionssystem *McrBC* ist, sollte um einen etwa 0.7 kbp großen Bereich erweitert werden. Zusätzlich sollte in dem methylierungsfreien Abschnitt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* vorhanden sein, um eine spätere Insertion von Oligodesoxynukleotiden mit *EcoRI*-kompatiblen Enden in das Plasmid zu ermöglichen.

Da die aus nur vier Basenpaaren bestehende Erkennungssequenz von *BsuFI* in natürlich vorkommenden DNA-Sequenzen relativ häufig anzutreffen ist, erfüllt nicht jeder beliebige DNA-Abschnitt die genannten Forderungen. Eine ausreichend lange DNA-Sequenz, die komplett frei von Sequenzen ist, die von *M.BsuFI* methyliert werden können, ist das Gen der *BsuFI*-Restriktionsendonuklease. Das für dieses Restriktionsenzym codierende Gen *hsrFI* wurde von W. Kapfer (1991) in den Vektor pBW5 (vgl. S. 47) kloniert und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Ein etwa 0.7 kbp großer Abschnitt aus dem *hsrFI*-Gen des Plasmids pBW5 wurde für den Ersatz eines etwa 0.4 kbp langen, methylierungshaltigen Abschnittes in pBW201, der sich dem 2.9 kbp langen methylierungsfreien Bereich anschließt, ausgewählt.

Das Ausgangsmaterial für die Generierung des Plasmids pMcrSb1 war somit neben pBW201 das Plasmid pBW5. Beide Plasmide wurden zunächst aus bakteriellen Systemen isoliert: pBW201 aus *E. coli* TC410 (pBW201) und pBW5 aus *E. coli* TAT2265 (pBW5). Das Plasmid pBW201 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (erkennt und schneidet die in pBW201 nur einmal vorkommende Sequenz 5'-G↓AATTC-3') zunächst linearisiert und in einem zweiten Schritt mit der Restriktionsendonuklease *AsuII* (erkennt und schneidet die in pBW201 ebenfalls nur einmal vorkommende Sequenz 5'-TT↓CGAA-3') für die Herstellung des Vektor-Rahmens verdaut. Aus den daraus entstandenen 4429 bzw. 424 nt langen Spaltprodukten wurde das lange Fragment mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese (vgl. S. 76) aufgereinigt und für die anschließende Ligation mit dem wie nachfolgend beschrieben präparierten Insert eingesetzt. Das Insert wurde aus dem Plasmid pBW5 durch schrittweisen Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ClaI* gewonnen. Das Plasmid pBW5 besitzt mehrere Schnittstellen für beide Endonukleasen, wobei das gesuchte Fragment ein etwa 2 kbp großes Produkt aus der zuerst durchgeführten Spaltung von pBW5 mit *EcoRI* ist. Das etwa 2 kbp lange gelaufgereinigte DNA-Stück enthält das gewünschte 698 nt lange *EcoRI/ClaI*-Fragment, das nach einer Spaltung mit dem Restriktionsenzym *ClaI* (erkennt und spaltet die DNA-Sequenz 5'-AT↓CGAT-3') durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert und ohne weitere Modifikation (z. B. einer Dephosphorylierung der 5'-ständigen Phosphatreste) in die Ligation (vgl. S. 95) eingesetzt wurde. Die durch *ClaI* bzw. *AsuII* entstandenen Enden des

Inserts aus pBW5 bzw. des Rahmens aus pBW201 sind kompatibel und ergeben durch die Ligation die nichtpalindrome Sequenz 5'-ATCGAA-3', wodurch sowohl die *AsuII*- als auch die *ClaI*-Erkennungssequenz zerstört wurde. Nach Fällung des Ligationsproduktes wurde die gewonnene Plasmid-DNA in elektrokompente Zellen (vgl. S. 62) des *mcrBC*-negativen Stammes *Escherichia coli* TC410 (s. S. 39) eingebracht (s. S. 98). Da pMcrSb1 das *bla*-Gen für eine Ampicillin-Resistenz aus pBW201 besitzt, wurde als Selektionsantibiotikum Ampicillin für die Anzucht der Transformanten verwendet (vgl. S. 35). Aus der großen Menge der erhaltenen Klone wurden 15 für eine Plasmidpräparation aus Flüssigkulturen ausgewählt und so auf den Gehalt von Plasmid der erwarteten Größenordnung überprüft. Elf Klone davon enthielten Plasmide, die für eine Kontrolle auf ein Merkmal von pMcrSb1, nämlich die Linearisierbarkeit durch *EcoRI*, geeignet erschienen. Von Plasmiden aus fünf Klonen, deren *EcoRI*-linearisierbares Plasmid die erwartete Größe zeigte, wurden mit den Restriktionsenzymen *PvuII* (erkennt und schneidet die in pMcrSb1 nur einmal vorkommende Sequenz 5'-CAG↓CTG-3', so dass das Plasmid linearisiert werden muss), *PvuII* mit *EcoRI* (durch den Doppelverdau müssen zwei Fragmente der Größen 649 bzw. 4480 bp entstehen), *AsuII* bzw. *ClaI* (diese Enzyme besitzen in pMcrSb1 keine Schnittstelle mehr), und *HpaI* (erkennt und schneidet die in pMcrSb1 zweimal vorkommende Sequenz 5'-GTT↓ATT-3', so dass zwei Fragmente mit den Größen 1022 bzw. 4107 bp entstehen müssen) verdaut. Das Plasmid eines Klons zeigte nach dem Restriktionsverdau die erwarteten Spaltpmuster und wurde über einen geeigneten Abschnitt mit den PCR-primern Sb1Hin und Sb1Rück (vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49) sequenziert. Die Überprüfung der Basenabfolge zeigte die erwartete Sequenz. Somit wurde mit pMcrSb1 ein methylierbares Plasmid geschaffen, das über einen Bereich von etwa 3000 bp keine Erkennungssequenzen für das Restriktionssystem McrBC besitzt (vgl. Abbildung 8). Die vollständige Sequenz von pMcrSb1 ist im Anhang (vgl. S. 287) angegeben.

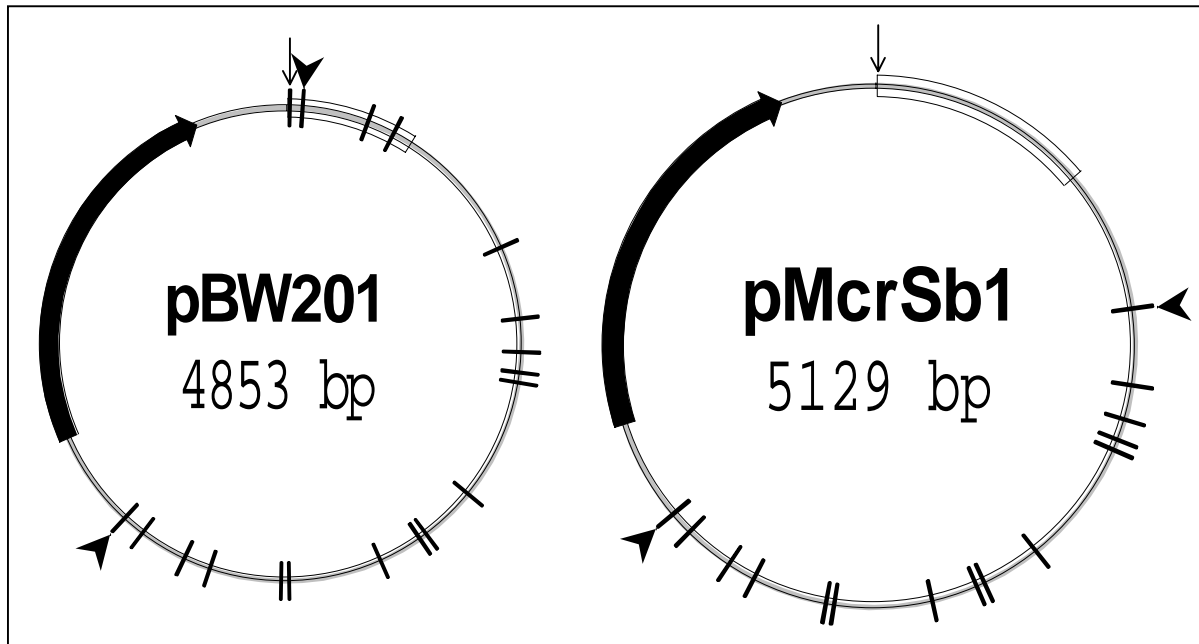


Abbildung 8: Verteilung der Methylierungspositionen von *M.BsuFI* in pBW201 und pMcrSb1.

Die zirkulären Plasmide pBW201 und pMcrSb1 sind schematisch als Kreise dargestellt, die relative Lage der Erkennungssequenzen von *M.BsuFI* (5'-CCGG-3') in beiden Plasmiden ist mit Querstrichen durch die Kreislinien markiert (für pBW201 sind die Positionen und der Sequenzkontext dieser 5'-CCGG-3'-Sequenzen in Abbildung 4 auf Seite 46 angegeben). Die dicken (dem Kreisumriss folgenden) Pfeile zeigen die relative Lage der für *M.BsuFI* codierenden *hsrFI*-Gene in den Plasmiden. Die dünnen Pfeile außerhalb der Kreise markieren die relative Lage der jeweils einzigen in den Plasmiden vorhandenen *EcoRI*-Erkennungssequenz (5'-GAATTC-3'). Als nicht ausgefüllte Balken ist der Sequenzbereich markiert, der beide gezeigten Plasmide unterscheidet. In pBW201 handelt es sich hierbei um das zur Generierung von pMcrSb1 entfernte *EcoRI/AsuII*-Fragment, in pMcrSb1 um das *EcoRI/ClaI*-Fragment aus pBW5, welches als Insert für die Herstellung von pMcrSb1 verwendet wurde. Die schwarzen Pfeilspitzen außerhalb der Kreise zeigen die relative Lage der McrBC-Erkennungssequenzen an, die jeweils den größten Abschnitt beider Plasmide abgrenzen, der frei von McrBC-Erkennungssequenzen ist. Dieser Abschnitt ist in pBW201 ca. 1.9 kbp lang, in pMcrSb1 3.0 kbp (*Hinweis*: aus der Methylierung der ersten *BsuFI*-Erkennungssequenz nahe der *EcoRI*-Erkennungssequenz in pBW201 ergibt sich keine Erkennungssequenz des McrBC-Systems).

3.1.3. pMcrSb2 und pMcrSb3

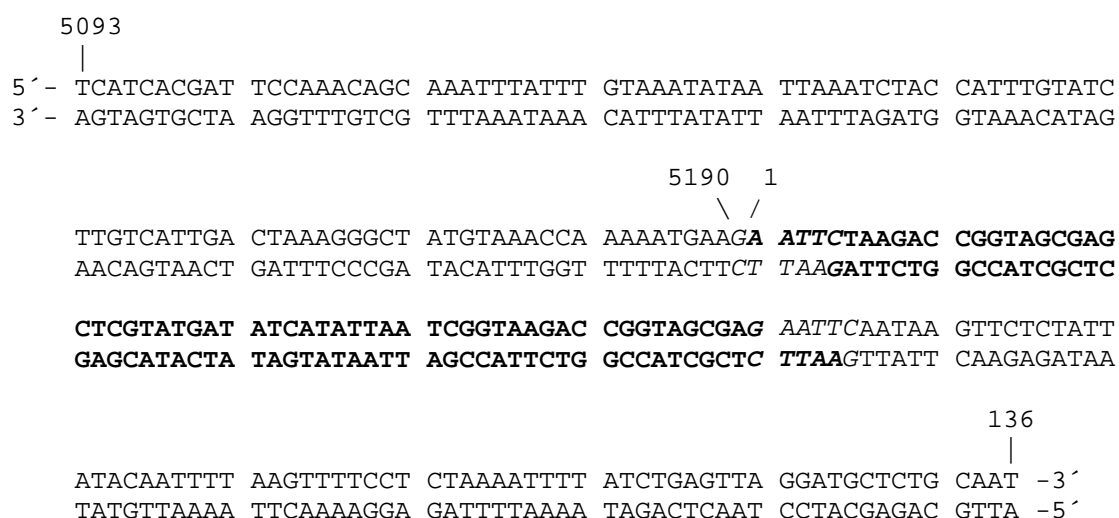
Die einzige Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3') liegt in dem 5129 bp großen Plasmid pMcrSb1 in einer etwa 3000 bp langen Sequenzumgebung, die auch nach Methylierung durch die *M.BsuFI* Methyltransferase (methyliert 5'-CCGG-3' zu 5'-MCGG-3', mit M = 5-Methylcytosin) frei von Erkennungssequenzen des McrBC-Restriktionssystems (5'-RM-3') ist. Die Position der *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb dieses Bereiches ist dabei nicht exakt zentral, sondern von der nächsten Erkennungssequenz von McrBC im bzw. gegen den Uhrzeigersinn in einem Verhältnis von etwa 2 : 3 entfernt. In diese *EcoRI*-Schnittstelle sollte ein kurzes Oligodesoxynukleotid inseriert werden, das nach

Methylierung durch das *M.Bsu*FI-System eine oder wenige Erkennungssequenzen für die McrBC-Restriktionsendonuklease in den langen methylierungsfreien Abschnitt einbringt. Als Insert wurde das 61 nt lange Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 (vgl. S. 114) ausgewählt, das zweimal die Erkennungssequenz 5'-CCGG-3' für *M.Bsu*FI enthält. Diese beiden Sequenzen sind durch 39 bp getrennt. Aus der Insertion der Sequenz von Sb61-11.11 in pMcrSb1 resultierten die Plasmide pMcrSb2 und pMcrSb3, die sich lediglich in der Orientierung der Sb61-Sequenz in der *Eco*RI-Schnittstelle von pMcrSb1 unterscheiden. Die Generierung der jeweils 5190 bp großen Substratplasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 ist im Folgenden beschrieben.

Ausgangsmaterial war eine Präparation von pMcrSb1 (vgl. S. 125) aus einer Flüssigkultur von *Escherichia coli* TC410 (pMcrSb1), die für eine Linearisierung des Plasmids pMcrSb1 mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI verwendet wurde. Die über ein Agarosegel aufgereinigte lineare DNA wurde mit dem aus einer Hybridisierung synthetischer Einzelstränge hergestellten Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 (vgl. S. 134) ligiert, womit elektrokompetente Zellen des Stammes *E. coli* TC410 transformiert wurden. Die Überprüfung auf Erfolg der Insertion des Oligodesoxynukleotids in pMcrSb1 geschah durch Präparation der Plasmide einiger aus der Transformation erhaltener Klone, wobei die erhaltenen Plasmide auf Spaltbarkeit mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RV getestet wurden. Während das Plasmid pMcrSb1 keine Erkennungssequenz von *Eco*RV (5'-GAT↓ATC-3') besitzt, verfügen Plasmide mit erfolgreicher Insertion des Oligodesoxynukleotids über eine *Eco*RV-Schnittstelle in der aus Sb61-11.11 stammenden Sequenz. Etwa 35 % der getesteten Klone enthielten durch *Eco*RV linearisierbare Plasmide der richtigen Größe¹. Die Plasmide von dreien dieser Klone wurden unter Verwendung der PCR-*primer* Sb1Hin und Sb1Rück (vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49) sequenziert (vgl. S. 96). Alle drei Plasmide erwiesen sich als pMcrSb1 mit der gewünschten Oligodesoxynukleotid-Insertion in der *Eco*RI-Schnittstelle, wobei beide möglichen Orientierungen der Sb61-Sequenz in der *Eco*RI-Schnittstelle gefunden wurden. Nachfolgend ist der mit Hilfe der PCR sequenzierte Bereich aus pMcrSb2 so gezeigt, dass die Orientierung der Sb61-Sequenz in pMcrSb2 erkennbar ist (die *Eco*RI-Erkennungssequenzen, 5'-GAATTC-3', sind kursiv hervorgehoben, die Sequenz des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 durch Fettdruck

¹ *Hinweis:* Nach optischer Einschätzung durch F.-U. Gast sollte der Bakterienklon mit der Nummerierung 26 auf der aus dem Ausstrich des Transformationsansatzes erhaltenen Agar-Platte die gewünschte DNA enthalten. Nach Präparation des entsprechenden Plasmids erwies sich dieses jedoch als nichtspaltbar durch das *Eco*RV-Restriktionsenzym. Trotzdem halte ich F.-U. Gast für einen großartigen Wissenschaftler.

dargestellt; bei der Nummerierung der Basenpositionen von pMcrSb2 und pMcrSb3 trägt die erste Base der vorderen *EcoRI*-Erkennungssequenz die Nummer 1). Der gezeigte Ausschnitt aus pMcrSb2 entspricht in seiner Sequenz dem 234 bp großen, *in vitro* methylierten PCR-Substrat Sb234a-11.11 (vgl. S. 147). Das Substratplasmid pMcrSb3 enthält die Sequenz von Sb61-11.11 in einer im Vergleich zu pMcrSb2 umgekehrten Orientierung in der *EcoRI*-Schnittstelle von pMcrSb1.



3.2. Plasmid-Fragmente

Die Plasmide pBW201, pBW201W, pMcrSb1, pMcrSb2 und pMcrSb3 wurden nicht nur in ihrer vollständigen Sequenz, d. h. in ihrer zirkulären oder in einer mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease linearisierten Form, als DNA-Substrat für die Untersuchung der DNA-Spaltung durch das GTP-abhängige Restriktionssystem McrBC eingesetzt, sondern auch in Form isolierter Sequenzabschnitte. Die Isolation einzelner gewünschter DNA-Abschnitte der Plasmide geschah im Rahmen dieser Arbeit entweder durch Amplifikation der gewünschten Sequenz mit der PCR-Methode (vgl. nachstehendes Kapitel) oder durch Ausschneiden aus den Plasmiden mit Hilfe ausgewählter Restriktionsendonukleasen. Die Auswahl der zu isolierenden Plasmidabschnitte erfolgte nach den jeweiligen experimentellen Anforderungen und der Art und Lage der durch die jeweilige Plasmidsequenz vorgegebenen spezifischen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Im Unterschied zu PCR-Produkten und synthetisch hergestellten DNA-Molekülen, die die für das McrBC-System spezifischen

Modifikationen durch synthetische Methylierungen in ihren Einzelsträngen oder *primern*, oder aber durch *in-vitro*-Methylierung erhalten, wurde die für die Gewinnung der Plasmidfragmente verwendete Plasmid-DNA *in vivo* methyliert. Da alle genannten Plasmide *in vivo* eine konstitutive Expression der m⁵C-Methyltransferase *M.BsuFI* bewirken, tragen sämtliche in den verwendeten Plasmidfragmenten vorhandenen Erkennungssequenzen von *BsuFI* (5'-CCGG-3') eine 5-Methylmodifikation am ersten Cytosinrest (5'-MCGG-3', mit M = 5-Methylcytosin). Um ihren Ursprung und damit die Herkunft der Methylierungsmodifikationen kenntlich zu machen, werden die Plasmidfragmente in dieser Arbeit mit der Bezeichnung *Pf* (für Plasmidfragment) beginnend benannt. Die dieser Abkürzung folgende Zahl gibt Auskunft über die Länge des Restriktionsfragmentes und bezeichnet die Anzahl der nach den Restriktionsspaltungen vorhandenen Nukleotide in einem Strang.

Die für diese Arbeit verwendeten Plasmidfragmente wurden durch präparativen Restriktionsverdau hergestellt (vgl. S. 94) und werden später im Zusammenhang ihrer Verwendung beschrieben. Lediglich ein verwendetes Restriktionsfragment, das als einzige Ausnahme nicht aus den oben genannten Plasmiden stammt, soll hier detailliert vorgestellt werden. Es handelt sich um das Fragment *Pf1793-11.10*, das aus einem nichtmethylierten Plasmid gewonnen und nach seiner Isolation *in vitro* methyliert wurde.

3.2.1. *Pf1793-11.10*

Die in Abbildung 9 schematisch dargestellte DNA *Pf1793-11.10* ist das einzige in dieser Arbeit untersuchte Plasmidfragment, das nicht durch die Methyltransferase *M.BsuFI* *in vivo* methyliert wurde. *Pf1793-11.10* ist ein 1793 bp langes Restriktionsfragment des Plasmids *pHisVDEΔSplice* und wurde nach seiner Aufreinigung *in vitro* durch die m⁵C-Methyltransferase *M.MspI* modifiziert. *Pf1793-11.10* sollte im Weiteren als DNA-Substrat für die Untersuchung der DNA-Bindung durch das Restriktionssystem *McrBC* mittels *scanning force microscopy* (SFM; vgl. S. 110) dienen. Hierfür sollte ein DNA-Substrat generiert werden, das eine Größe von 1.5 bis 2.5 kbp aufweist und zwei Bindungsstellen für *McrBC*-Komplexe besitzt, die asymmetrisch in dem Substrat verteilt sind und einen Abstand von über 200 bp zueinander haben. Durch die Größe des DNA-Moleküls und den relativ großen Abstand der unsymmetrisch verteilten *McrBC*-Erkennungssequenzen sollte mit Hilfe der *scanning force microscopy* eine eindeutige Erkennung spezifischer Bindungsereignisse von Komponenten des *McrBC*-Systems ermöglicht werden (vgl. S. 152).

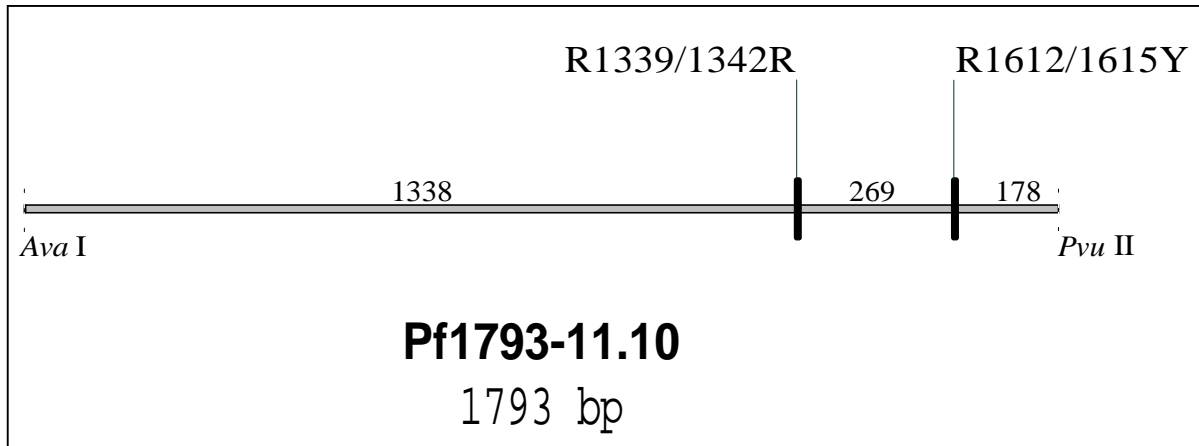


Abbildung 9: Lokalisation von 5-Methylcytosin im Plasmidfragment Pf1793-11.10.

Das lineare Plasmidfragment ist schematisch als Balken dargestellt, wobei sich das durch *Ava*I erzeugte Ende in der Darstellung links, das durch *Pvu*II erzeugte Ende rechts befindet. Die relative Lage der aus einer Methylierung durch die *M.Msp*I-Methyltransferase hervorgehenden 5-Methyl-modifizierten Cytosinreste in der DNA ist mit Querstrichen durch die Balkenlinie markiert. Angegeben für die markierten Positionen ist die Nummer des Basenpaares, in dem sich das 5-Methylcytosin befindet, wobei die Positionsnummer von m⁵C-Resten, die sich im *oberen* DNA-Strang befinden, *vor* dem Schrägstrich (/) angegeben sind, die von m⁵C-Resten des *unteren* Stranges *nach* dem Schrägstrich. Bei der jeweiligen Angabe der Positionsnummer ist zusätzlich vermerkt, ob sich ein Purinrest (R) oder ein Pyrimidinrest (Y) im Nukleotid 5'-stehend zu m⁵C befindet (bei Angaben, die sich auf den *unteren* DNA-Strang beziehen, wurde das 5'-stehende Nukleotid *hinter* der Positionsnummer des m⁵C-Restes angegeben, da es einen höhere Positionsnummer besitzt als der m⁵C-Rest). Aus den Angaben ist ersichtlich, wo sich aus der *M.Msp*I-Methylierung Erkennungssequenzen von McrBC ergeben (mit R vermerkte Positionen) oder nicht (mit Y vermerkte Positionen). Die direkt am Balken befindlichen Zahlen bezeichnen die Anzahl der Basenpaare, die zwischen den *Msp*I-Erkennungssequenzen liegen bzw. diese vom jeweils nächsten DNA-Ende trennen.

Das Plasmid pHisVDE Δ Splice (vgl. S. 48) wurde aus einer Flüssigkultur von *Escherichia coli* TC410 (pHisVDE Δ Splice) als Plasmid-Midipräparation aufgereinigt (vgl. S. 84) und präparativ mit den Restriktionsendonukleasen *Ava*I (erkennt und schneidet die Basensequenz 5'-C \downarrow TCGAG-3', die in pHisVDE Δ Splice nur einmal vorkommt; verwendet wurde ein Isoschizomer von *Ava*I, *Eco*88I) und *Pvu*II (erkennt und schneidet die in pHisVDE Δ Splice ebenfalls nur singulär vorkommende Basensequenz 5'-CAG \downarrow CTG-3') verdaut. Die Restriktionsspaltung des Plasmids erfolgte mit gleichen Mengen beider Enzyme gleichzeitig in einem Puffer, der aus 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 66 mM KCl und 100 ng \cdot μ l⁻¹ BSA bestand. Von den beiden erhaltenen, 1793 bzw. 3004 bp großen Spaltprodukten wurde das gewünschte 1793 bp große Fragment mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (vgl. S. 76) aufgereinigt und *in vitro* mit der *M.Msp*I Methyltransferase methyliert. *M.Msp*I methyliert DNA-Sequenzen der Art 5'-CCGG-3' zu 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin). Der Erfolg der Methylierung wurde durch eine Testspaltung des

Methylierungsprodukts mit dem Restriktionsenzym *HpaII* überprüft (vgl. Kapitel *Methylierung von DNA*, S. 90). Die erfolgreich methylierte DNA wurde vor ihrer Verwendung als Substrat in der *scanning force microscopy* über Gel-Elektrophorese aufgereinigt, wodurch eine Lösung von $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Pf1793-11.10 in NE-Puffer (Fa. Macherey-Nagel, Düren) erhalten wurde.

Pf1793-11.10 enthält zwei Erkennungssequenzen für *M.SspI*, die 1338 bzw. 178 bp von den Enden des Moleküls entfernt sind und durch 269 bp getrennt werden (vgl. Abbildung 9 auf S. 132). Aus der Methylierung der Sequenz 5'-CCGG-3' nahe der *PvuII*-Schnittstelle (Pos. 1525 bis 1529 in Pf1793-11.10) ergibt sich eine Erkennungssequenz für McrBC in Form von 5'-GM-3' im oberen Strang (Pos. 1525/1526; im unteren Strang ist der Kontext des methylierten Cytosins 5'-CM-3'), aus der Methylierung der anderen *MspI*-Erkennungssequenz (Pos. 1253 bis 1256) ergeben sich zwei McrBC-Erkennungssequenzen, jeweils in der Form 5'-GM-3' (Pos. 1252/1253, oberer Strang, bzw. Pos. 1256/1257, unterer Strang). Eine erfolgreiche Spaltung des so präparierten Pf1793-11.10 mit dem McrBC-Restriktionssystem zeigte, dass diese DNA ein geeignetes Substrat für die Untersuchung der DNA-Bindung durch McrBC ist. Der Spaltansatz bestand aus 175 ng Pf1793-11.10, 3 μM GST-McrB, 1 μM GST-McrC, 10 mM GTP in HMD/Gly/KCl-Puffer und wurde mit parallel angesetzten Kontrollen (vgl. S. 111) für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auswertung (vgl. S. 76) des Spaltansatzes zeigte entstandene Spaltprodukte in den dominierend vertretenen Größenordnungen 1.3 und 1.5 kbp (DNA-Fragmente < 0.7 kbp wurden nicht detailliert aufgelöst).

3.3. DNA-Hybridisierung

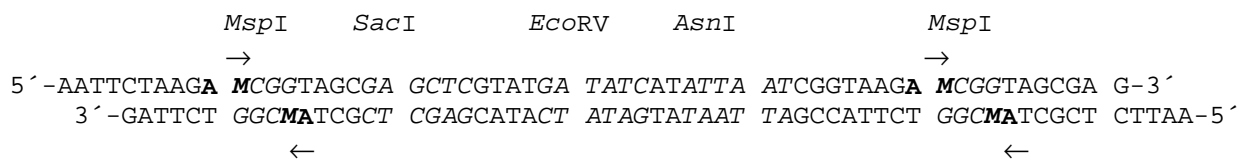
Durch Hybridisierung (vgl. S. 83) wurden aus synthetisch hergestellten DNA-Einzelsträngen nachstehende 61 bzw. 128 bp lange Doppelstränge hergestellt. Beide Moleküle unterscheiden sich in der Art des verwendeten Purinrestes der in ihnen enthaltenen Erkennungssequenzen des McrBC-Restriktionssystems (5'-RM-3', mit M = 5-Methylcytosin).

Hier sei eine kurze Anmerkung zur Benennung der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Produkte und doppelsträngigen Oligodesoxynukleotide gegeben: Die Bezeichnung *Sb* steht für *Substrat-DNA*, die dieser Bezeichnung folgende Zahl bezeichnet die Länge des doppelsträngigen DNA-Moleküls, angegeben als Anzahl der Nukleotide in einem Strang (bei DNA-Molekülen mit glatten Enden entspricht diese der Anzahl der Basenpaare). Die dem

Bindestrich bzw. dem *Minus*-Zeichen (-) folgenden Zahlen geben Auskunft über eine Anwesenheit (1) oder das Fehlen (0) von 5'-RM-3' Sequenzen an möglichen Methylierungspositionen im oberen (erste Ziffer der zweistelligen Zahl) und unteren DNA-Strang (zweite Ziffer der zweistelligen Zahl), wobei die sich aus den vorhandenen Methylierungspositionen ergebenden McrBC-Erkennungselemente einzeln aufgeführt sind und durch einen Punkt getrennt angegeben werden. So ist das 61 bp lange Sb61-11.11 an zwei Erkennungselementen in beiden DNA-Strängen methyliert und enthält dadurch insgesamt vier 5'-RM-3' Sequenzen, das 128 bp lange Sb128-00.01 enthält zwei potenzielle Methylierungspositionen, von denen aber nur die zweite an einem DNA-Strang methyliert (hemimethyliert) ist und tatsächlich eine Sequenz 5'-RM-3' enthält. Die vollmethylierte Variante von Sb128-00.01 mit insgesamt vier 5'-RM-3' Sequenzen heißt Sb128-11.11. Zu beachten ist, dass sich aus einer Methylierung nur dann eine Erkennungssequenz für McrBC ergibt, wenn vor (d. h. 5' zu) dem 5-Methylcytosin ein purinhaltiges Nukleotid (R) steht. Die Sequenz 5'-YM-3' ergibt keine Erkennungssequenz für das McrBC-System und ist in der Benennung der Oligodesoxynukleotide mit der Ziffer 0 gekennzeichnet.

3.3.1. Sb61-11.11

Das Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 besitzt folgende Sequenz, in der McrBC-Erkennungssequenzen (5'-AM-3', mit M = 5-Methylcytosin) fett hervorgehoben und in ihrer Orientierung mit einem Pfeil markiert sind. Die Erkennungssequenzen der angegebenen Restriktionsenzyme sind kursiv hervorgehoben.



Dieses Substrat wurde konstruiert, um ein optimales Spaltsubstrat für die Charakterisierung von McrBC zu besitzen. Hinter der Bezeichnung *optimal* stecken die experimentellen Anforderungen an eine minimale Länge und an ein minimales Vorkommen an McrBC-Erkennungssequenzen bei dennoch guter Spaltbarkeit durch das McrBC-System. Bei der Konstruktion von Sb61-11.11 wurden die zu der Zeit vorhandenen Kenntnisse über die Substratanforderungen von McrBC für eine DNA-Spaltung berücksichtigt, wonach zwei

Erkennungssequenzen mit einem Abstand von mindestens 40 bp vorhanden sein müssen. Da bereits bekannt war, dass die Sequenzumgebung um die Erkennungssequenzen die DNA-Bindung von McrBC beeinflussen kann, basieren die Sequenzen der McrBC-Erkennung und deren Umgebung in Sb61-11.11 auf einem Oligodesoxynukleotid mit singulärer McrBC-Erkennungssequenz, das gut vom McrBC-System gebunden wird (Oligodesoxynukleotid *MHI*; Hahn, 1991; Gast *et al.*, 1997). Zusätzlich sollte das Substrat Schnittstellen für einige Restriktionsenzyme besitzen, um das Oligodesoxynukleotid für weitere Experimente modifizierbar zu machen.

Das aus den genannten Überlegungen resultierende Substrat Sb61.2.2 besitzt 5'-überhängende Enden, die dem Produkt einer DNA-Spaltung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓AATTC-3') entsprechen und so eine Ligation dieses Oligodesoxynukleotids mit *EcoRI*-geschnittenen DNA-Fragmenten erlauben (vgl. S. 124 und S. 128). Pro Strang besitzt das Substrat Sb61-11.11 zwei Erkennungssequenzen des Restriktions-/Modifikationssystems *MspI* (5'-CCGG-3'), die durch jeweils 36 nt voneinander getrennt sind. Das erste Cytosinnukleotid dieser Sequenzen besitzt jeweils eine Methylierung am C5-Atom des Cytosins und ein 5'-voranstehendes Adeninnukleotid, woraus sich jeweils eine 5'-AM-3' Erkennungssequenz für das McrBC-System ergibt. Das Substrat Sb61-11.11 besitzt also insgesamt vier Erkennungssequenzen für McrBC, pro DNA-Strang zwei in gleicher Orientierung. Zwischen den methylierten Cytosinen eines Stranges liegen 39 Basenpaare, die Erkennungssequenzen sind demnach also 40 bp voneinander entfernt. Damit sind mit dem Substrat Sb61-11.11 die gesteckten Ziele seines Entwurfes (zumindest theoretisch) verwirklicht. Die Erkennungssequenzen beider Stränge liegen in gegenläufiger Orientierung, wobei sich jeweils zwei Sequenzen über eine *MspI*-Erkennungssequenz schräg gegenüberstehen (und somit vermutlich ein Erkennungselement für McrBC bilden).

In dieser Arbeit wurde das DNA-Substrat Sb61-11.11 als Hybridisierungsprodukt (vgl. S. 83) der synthetisch hergestellten, jeweils 61 nt langen und zueinander komplementären DNA-Einzelstränge Sb61Hin und Sb61Rück (s. S. 55) hergestellt. Das Substrat Sb61-11.11 wurde nicht nur als Oligodesoxynukleotid in Experimenten mit dem Restriktionssystem McrBC eingesetzt, sondern auch in einer erweiterten Sequenzumgebung. Hierzu wurde Sb61-11.11 in die jeweils singulär vorkommenden *EcoRI*-Schnittstellen von pBW201 und pMcrSb1 eingesetzt (s. dort).

3.3.2. Sb128-11.11

Das 128 bp große DNA-Substrat Sb128-11.11 entspricht in seiner Sequenz einem Ausschnitt aus dem Plasmid pMC63 (Pos. 1811 bis 3 in der im Anhang angegebenen Sequenz, vgl. S. 286), das nach Methylierung durch die m^5C -Methyltransferase *M.FnuDII* von Steward & Raleigh (1998) für Untersuchungen des McrBC-Restriktionssystems eingesetzt wurde. Die DNA Sb128-11.11 ist Teil der Sb128-Substratgruppe (siehe Kapitel *DNA der Sb128-Gruppe*, S. 141), deren Mitglieder identische Sequenzen besitzen, sich aber in ihrem Methylierungsmuster unterscheiden. Das Substrat Sb128-11.11 entspricht in seinem Methylierungsmuster dem durch *M.FnuDII* methylierten Ausschnitt von pMC63. Pro DNA-Strang sind mit 5'-GM-3' zwei gleich orientierte McrBC-Erkennungssequenzen vorhanden, zwischen denen 62 Nukleotide liegen. Somit sind die McrBC-Erkennungssequenzen auf einem Strang 63 bp voneinander entfernt. Die Erkennungssequenzen von McrBC im Gegenstrang stehen relativ zu denen des Hinstranges in entgegengesetzter Orientierung, wobei sich jeweils zwei 5'-GM-3' Sequenzen über die *FnuDII*-Erkennungssequenz hinweg schräg gegenüberstehen (und vermutlich ein Erkennungselement für McrBC ergeben).

Das Substrat Sb128-11.11 wurde in dieser Arbeit als Hybridisierungsprodukt der synthetisch hergestellten und zueinander komplementären DNA-Einzelstränge MC63-1bmh und MC63-1mr (vgl. S. 53) gewonnen.

3.4. PCR-Produkte

Mit Hilfe der PCR-Methode wurden verschiedene DNA-Substrate hergestellt. Um ein Substrat für eine Bindung oder Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem zu sein, muss die DNA bestimmte Methylierungen in bestimmter Anordnung tragen. Die in dieser Arbeit verwendeten Modifikationen in PCR-Produkten sind 5-Methylcytosine, die zum Einen durch Verwendung 5-Methylcytosin enthaltender *primer* während der PCR in das entstehende Produkt eingeführt wurden, zum Anderen nach Beendigung der PCR durch *in-vitro*-Methylierung mit der *M.MspI*-DNA-Methyltransferase gewonnen wurden. Der Erfolg der nachträglichen Methylierung wurde durch Kontrollspaltungen mit den Restriktionsendonukleasen *MspI* oder *HpaII* überprüft. Beide Restriktionsenzyme vermögen durch *M.MspI* methylierte DNA-Sequenzen nicht zu spalten.

Die PCR-Produkte werden nach dem im Kapitel *DNA-Hybridisierung* (s. S. 133) erläuterten Schema benannt. Im einzelnen wurden folgende DNA-Substrate mit der PCR-Methode generiert und aufgereinigt.

3.4.1. Sb73-10.01.00

Das 73 bp lange DNA-Substrat Sb73-10.01.00 war das erste Modellsubstrat dieser Arbeit. Es resultierte aus einer PCR, die mit den methylierten *primern* MspI-1 und MspI-Anti1 durchgeführt wurde. Als *template* diente das Plasmid pBR322 (NCBI *Taxonomy ID*: 47470). Die Sequenz des PCR-Produkts entspricht der pBR322-Sequenz im Bereich von Pos. 2056 bis 2128 (die Nummerierung bezieht sich auf die in der NCBI Datenbank veröffentlichten Sequenz von pBR322), weicht aber durch die verwendeten *primer* in einigen Positionen von dieser Sequenz ab (Pos. 2065, 2066, 2068, 2114, 2115, 2117, 2118). Die Sequenz von Sb73 enthält durch die Änderungen in der Sequenz drei *MspI*-Erkennungssequenzen (5'-CCGG-3'), von denen aber nur die erste und die zweite ein 5-methyliertes Cytosin enthält. In der nachfolgend gezeigten Sequenz von Sb73 befinden sich die drei *MspI*-Erkennungssequenzen an den Positionen 11 bis 14, 60 bis 63 und 64 bis 67 (fett hervorgehoben; M = 5-Methylcytosin). Die aus den Methylierungen hervorgehenden McrBC-Erkennungssequenzen (Pos. 10/11, oberer Strang, und 63/64, unterer Strang) sind gegenläufig orientiert und durch 51 bp getrennt. Der für die in dieser Arbeit einheitliche Benennung der PCR-Produkte richtige Name ist nach der Organisation der M.*MspI*-methylierbaren Sequenzen und der tatsächlich durch die methylierten *primer* erhaltenen McrBC-Erkennungssequenzen Sb73-10.01.00, aber da im Rahmen dieser Arbeit keine entsprechenden Variationen dieses PCR-Produkts hergestellt wurden, wird der Substratname hier teilweise mit Sb73 abgekürzt.

```

          10          20          30          40          50          60
          |          |          |          |          |          |
5' - CTTTACCGCG MCGGCCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCGC
3' - GAAATGGCGC GGCCGGAGCG CGCAAAGCCA CTACTGCCAC TTTTGGAGAC TGTGTACGCG

          70
          |
CGGCCGGGAGA CGG -3'
GCMGGCCTCT GCC -5'

```

3.4.2. DNA der Sb82-Gruppe

Die Bezeichnung Sb82 tragen 82 bp große DNA-Moleküle, die als PCR-Produkte, basierend auf dem *template*-Plasmid pBR322, entstanden. Die für eine Untersuchung des Restriktionssystems McrBC notwendigen spezifischen Modifikationen wurden durch Verwendung methylierter *primer* in die Substrat-DNA eingeführt. DNA der Sb82-Gruppe ist also hemimethyliert (Sb82-10.01) und enthält dadurch Erkennungssequenzen für das Restriktionssystem McrBC in Form von 5'-GM-3' (mit M = 5-Methylcytosin) oder ist unmethyliert (Moleküle für Kontrollexperimente, Sb82-00.00). Über die verwendeten *primer* wurde die durch das *template* vorgegebene Sequenz in geringem Umfang abgeändert. Dies diente zum Teil der Erzeugung von Erkennungssequenzen für das Restriktions-/Modifikationssystem *MspI* (5'-CCGG-3'), eine andere Absicht war die Zerstörung einer bestimmten in dem Produkt der PCR vorhandenen Erkennungssequenz des aus *Arthrobacter luteus* stammenden R/M-Systems *AluI* (5'-AGCT-3'), da für diese Substrate zunächst eine *in-vitro*-Methylierung mit der C-Methyltransferase M.*AluI* vorgesehen war. Der Unterschied zwischen den in dieser Arbeit hergestellten und aufgereinigten Substraten, die nachfolgend aufgeführt sind, besteht neben der Methylierungsquantität in der Position der eingeführten Methylierungen.

3.4.2.a. Sb82a-00.00

primer Lisa1-A (unmethyliert) und Lisa1-B (unmethyliert), keine Erkennungssequenz für McrBC.

Bemerkung: Durch den Basenaustausch C→G im verwendeten *primer* Lisa1-A (Pos. 3) wird die erste der drei im *template* pBR322 vorhandenen *AluI*-Erkennungssequenzen, 5'-AGCT-3', zerstört (5'-AGGT-3', Pos. 1 bis 4 im PCR-Produkt).

Die Basensequenz von Sb82a-00.00 entspricht der von Sb82a-10.01, die DNA ist aber nicht methyliert.

3.4.2.b. Sb82a-10.01

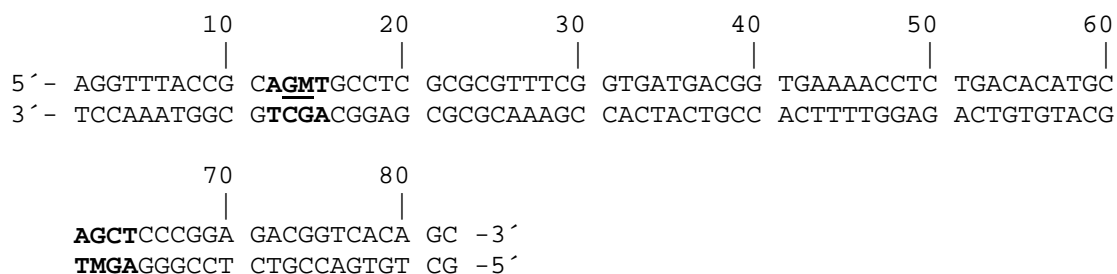
primer Lisa1m-A (Methylierung an *primer*-Pos. 14) und Lisa1m-B (Methylierung an *primer*-Pos. 21), zwei Erkennungssequenzen für McrBC (Pos. 13/14, oberer Strang; Pos. 62/63, unterer Strang),

Orientierung der Erkennungssequenzen: gegenläufig (separiert durch 47 bp).

Bemerkung: Durch den Basenaustausch C→G im verwendeten *primer* Lisa1m-A (Pos. 3) wird die erste der drei im *template* pBR322 vorhandenen *AluI*-Erkennungssequenzen, 5'-AGCT-3', zerstört (5'-AGGT-3', Pos. 1 bis 4 im PCR-Produkt). Beide durch die *primer* eingebrachten Methylierungen

entsprechen einer Hemimethylierung durch *M.AluI* in der Sequenzumgebung 5'-AGMT-3'.

Sb82a-10.01 besitzt nachstehende Sequenz, in der die *AluI*-Erkennungssequenzen fett hervorgehoben und die *McrBC*-Erkennungssequenzen unterstrichen sind.



3.4.2.c. Sb82b-00.00

primer Lisa2-A (unmethyliert) und Lisa2-B (unmethyliert), keine Erkennungssequenz für *McrBC*.

Bemerkung: Durch den Basenaustausch C→G im verwendeten *primer* Lisa2-A (Pos. 3) wird die erste der drei im *template* pBR322 vorhandenen *AluI*-Erkennungssequenzen, 5'-AGCT-3', zerstört (5'-AGGT-3', Pos. 1 bis 4 im PCR-Produkt), durch zwei weitere Basenaustausche (T→C, Pos. 15, und C→G, Pos. 16 in Lisa2-A) wird die zweite vorhandene *AluI*-Erkennungssequenz in eine Erkennungssequenz von *MspI* abgeändert (5'-CCGG-3', Pos. 14 bis 17 im PCR-Produkt). Gleiches gilt für den verwendeten *primer* Lisa2-B, der durch drei Basenaustausche (G→C, G→C und A→G, Pos. 17 bis 19 in Lisa2-B), die dritte *AluI*-Erkennungssequenz ebenfalls in eine *MspI*-Erkennungssequenz abändert (5'-CCGG-3', Pos. 66 bis 63 im PCR-Produkt).

Die Sequenz von Sb82b-00.00 entspricht der von Sb82b-10.01, ist aber nicht methyliert.

3.4.2.d. Sb82b-10.01

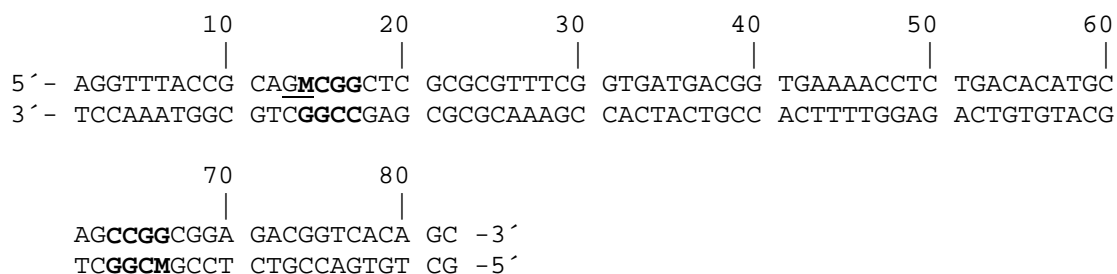
primer Lisa2m-A (Methylierung an *primer*-Pos. 14) und Lisa2m-B (Methylierung an *primer*-Pos. 17), zwei Erkennungssequenzen für *McrBC* (Pos. 13/14, oberer Strang; Pos. 66/67, unterer Strang),

Orientierung der Erkennungssequenzen: gegenläufig (separiert durch 51 bp).

Bemerkung: Durch den Basenaustausch C→G im verwendeten *primer* Lisa2m-A (Pos. 3) wird die erste der drei im *template* pBR322 vorhandenen *AluI*-Erkennungssequenzen, 5'-AGCT-3', zerstört (5'-AGGT-3', Pos. 1 bis 4 im PCR-Produkt), durch zwei weitere Basenaustausche (T→C, Pos. 15, und C→G, Pos. 16 in Lisa2m-A) wird die zweite vorhandene *AluI*-Erkennungssequenz in eine Erkennungssequenz von *MspI* abgeändert (5'-CCGG-3', Pos. 14 bis 17 im PCR-Produkt). Gleiches gilt für den verwendeten *primer* Lisa2m-B, der durch drei Basenaustausche (G→C, G→C und A→G, Pos. 17 bis 19 in Lisa2m-B), die dritte *AluI*-Erkennungssequenz ebenfalls in eine *MspI*-Erkennungssequenz abändert (5'-CCGG-3', Pos. 66

bis 63 im PCR-Produkt). Beide durch die *primer* eingebrachten Methylierungen entsprechen einer Hemimethylierung durch *M.MspI* in der Sequenzumgebung 5'-GMCGG-3'.

Sb82b-10.01 besitzt nachstehende Sequenz, in der die *MspI*-Erkennungssequenzen fett hervorgehoben und die *McrBC*-Erkennungssequenzen unterstrichen sind.



3.4.3. DNA der Sb99-Gruppe

Zwei in dieser Arbeit hergestellte, jeweils 99 bp große DNA-Moleküle sind unter der Bezeichnung Sb99 zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um sequenzgleiche PCR-Produkte, die sich in ihrem Methylierungsstatus unterscheiden. Sie besitzen eine große Sequenzverwandtschaft mit DNA der zuvor beschriebenen Sb82-Gruppe, und wurden, wie diese auch, unter Verwendung des Plasmids pBR322 als *template* für die PCR-Reaktion hergestellt. Im Unterschied zu den PCR-Produkten der Sb82-Gruppe, die in ihren methylierten Formen pro Strangende nur eine einzige Methylierung in der DNA tragen (Sb82-10.01), besitzt die methylierte Form der Sb99-DNA pro Strangende zwei eng benachbarte Methylierungen in je einem DNA-Strang, aus denen sich jeweils eine Erkennungssequenz für *McrBC* ergibt (also insgesamt vier, jede in der Form 5'-GM-3', mit M = 5-Methylcytosin). Die beiden jeweils aus benachbarten (*in cis* orientierten) *McrBC*-Erkennungssequenzen bestehenden Erkennungselementpärchen sind gegenläufig orientiert, analog zu der Situation der beiden einzeln stehenden *McrBC*-Erkennungssequenzen in der Sb82-DNA. Die *McrBC*-Erkennungssequenzen stehen jeweils in dem Sequenzkontext 5'-AGMT-3', der einer Methylierung der Sequenz 5'-AGCT-3' durch die Methyltransferase *M.AluI* entspricht. Aufgrund der engen räumlichen Nähe von jeweils zwei *McrBC*-Erkennungssequenzen in einem Strang des PCR-Produkts wird die methylierte Form der DNA Sb99-20.02 genannt (und nicht Sb99-10.10.01.01), im Unterschied zu der als Sb99-00.00 bezeichneten unmethylierten Form. Beide DNA-Moleküle wurden in dieser Arbeit unter Verwendung folgender *primer* hergestellt und aufgereinigt.

3.4.3.a. Sb99-00.00

primer Lisa3-A (unmethyliert) und Lisa3-B (unmethyliert),
keine Erkennungssequenz für McrBC.

3.4.3.b. Sb99-20.02

primer Lisa3m-A (Methylierungen an *primer*-Pos. 11 und 22),
Lisa3m-B (Methylierungen an *primer*-Pos. 11 und 30),
vier Erkennungssequenzen für McrBC:

oberer Strang: Pos. 10/11 und 21/22,

unterer Strang: Pos. 70/71 und 89/90,

Orientierung der Erkennungssequenzen:

in cis liegende Sequenzen: gleichläufig, separiert durch 9 (oberer Strang) bzw. 17 bp (unterer Strang),

in trans liegende Sequenzen: gegenläufig (innere Sequenzen separiert durch 47 bp).

Sb99-20.02 besitzt folgende Sequenz, in der die *AluI*-Erkennungssequenzen fett hervorgehoben und die McrBC-Erkennungssequenzen unterstrichen sind.

```

          10          20          30          40          50          60
          |          |          |          |          |          |
5' - CGCTGATGAG MTTTTACCGCA GMTGCCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG
3' - GCGACTACTC GAAATGGCGT CGACGGAGCG CGCAAAGCCA CTACTGCCAC TTTTGGAGAC

          70          80          90
          |          |          |
ACACATGCAG CTCCCGGAGA CGGTCACAGC TTGTCTGTA -3'
TGTGTACGTM GAGGGCCTCT GCCAGTTMG AACAGACAT -5'

```

3.4.4. DNA der Sb128-Gruppe

Hierbei handelt es sich um 128 bp lange PCR-Produkte, die durch Verwendung teilweise methylierter *primer* unter Vorlage (*template*) des Plasmides pMC63 (vgl. Kapitel *pMC63*, S. 47) hergestellt wurden. Die Mitglieder dieser Substratgruppe besitzen identische Sequenzen und unterscheiden sich lediglich in ihrem Methylierungsmuster, aus dem sich Erkennungssequenzen für das McrBC-Restriktionssystem in unterschiedlicher Anzahl, Orientierung und Verteilung ergeben. Als Purinrest der McrBC-Erkennungssequenz enthalten alle Substrate der Sb128-Gruppe einen Guaninrest. Zu der Sb128-DNA gehört auch das oben beschriebene Hybridisierungsprodukt Sb128-11.11 (s. S. 134). Nachstehende Basensequenz liegt allen DNA-Molekülen der Sb218-Gruppe zugrunde (Erkennungssequenzen für *FnuDII*, 5'-CGCG-3', sind kursiv hervorgehoben, mögliche Methylierungspositionen unterstrichen):

```

          10          20          30          40          50          60
5' - ACCCCATCGA TAAGCTGTCA AACAGATCTG CGCGCAGAGC TTGCATGCCT GCAGGTCGAC
3' - TGGGGTAGCT ATTCGACAGT TTGTCTAGAC GCGCGTCTCG AACGTACGGA CGTCCAGCTG

          70          80          90          100          110          120
TCTAGAGGAT CCCCGGGTAC CGAGCTCGAA TTTGCGCGCT CGAGTCTACG CCGGACGCAT
AGATCTCCTA GGGGCCCATG GCTCGAGCTT AAACGCGCGA GCTCAGATGC GGCCTGCGTA

          128
          |
CGATGGAG -3'
GCTACCTC -5'

```

Unter Verwendung zirkulären Plasmids pMC63 (vgl. S. 286) als *template* für die Reaktion wurden mit der PCR-Methode nachstehende DNA-Substrate hergestellt. Die hier angegebenen PCR-*primer*, die für die Produktion der jeweiligen Substrate verwendet wurden, sind im Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49 ff., beschrieben. Die *forward-primer* besitzen eine 5'-stehende Biotinylierung, was die PCR-Produkte für eine Bindung an Streptavidin geeignet macht. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit für Experimente mit dem BIAcore-Instrument (vgl. Kapitel *Oberflächen-Plasmonresonanz*, S. 105) benötigt. Derartige biotinylierte Substrat-DNA wurde zum Erzielen einer sauberen Abtrennung verbleibender *primer* nach der PCR mit Hilfe einer Präparation aus einem Agarose-Gel aufgereinigt.

3.4.4.a. Sb128-00.00

primer MC63-2bh (unmethyliert) und MC63-2r (unmethyliert), keine Erkennungssequenz für McrBC.

3.4.4.b. Sb128-00.01

primer MC63-2bh (unmethyliert) und MC63-2mr (Methylierung an *primer*-Pos. 31), eine Erkennungssequenz für McrBC (Pos. 98/99, unterer Strang).

3.4.4.c. Sb128-10.00

primer MC63-2bmh (Methylierung an *primer*-Pos. 31) und MC63-2r (unmethyliert), eine Erkennungssequenz für McrBC (Pos. 30/31, oberer Strang).

3.4.4.d. Sb128-10.01

primer MC63-2bmh (Methylierung an *primer*-Pos. 31) und MC63-2mr (Methylierung an *primer*-Pos. 31),
zwei Erkennungssequenzen für McrBC (Pos. 30/31, oberer Strang; Pos. 98/99, unterer Strang),
Orientierung der Erkennungssequenzen: gegenläufig (separiert durch 66 bp).

3.4.5. DNA der Sb157-Gruppe

Mit der Abkürzung Sb157 werden eine Reihe sequenzähnlicher, 157 bp großer PCR-Produkte bezeichnet, die in dieser Arbeit als Substrat-DNA für die Untersuchung des Restriktionssystems McrBC generiert wurden. Im Unterschied zu den voranstehend beschriebenen Substratmolekülen der Sb128-Gruppe wurden Methylierungen in die Sb157-DNA nicht durch Verwendung entsprechend methylierter PCR-*primer* eingeführt, sondern nach Abschluss der PCR durch *in-vitro*-Methylierung mit der m^5C -Methyltransferase *M.MspI*. Die unterschiedliche Anzahl und Verteilung von McrBC-Erkennungssequenzen resultiert hier also nicht aus einer quantitativ unterschiedlichen Methylierung, sondern aus der unmittelbaren Sequenzumgebung der *MspI*-Erkennungssequenz (5'-CCGG-3'; an dieser Stelle sei daran erinnert, dass *M.MspI* den ersten Cytosinrest dieser Sequenz methyliert, vgl. Kapitel *Erkennungssequenzen und Erkennungselemente*, S. 27). Die durchgeführte PCR zur Herstellung aller Sb157-Moleküle basierte auf der Verwendung des zirkulären *templates* pBW201 (Sb157-DNA entspricht dem Abschnitt von Pos. 236 bis Pos. 392 in der im Anhang gezeigten Sequenz von pBW201, vgl. S. 282). Abgesehen von einem speziellen Teil der Sb157-Gruppe besitzen alle Sb157-Moleküle zwei Erkennungssequenzen für *M.MspI* und somit insgesamt vier Methylierungen, woraus sich je nach 5'-stehender Base (A oder C) eine Erkennungssequenz für McrBC ergibt (5'-AM-3', bezeichnet jeweils mit *I*) oder nicht (5'-CM-3', bezeichnet mit *O*). Die unmittelbare Sequenzumgebung der *MspI*-Erkennungssequenzen in der Sb157-DNA wurde durch Verwendung entsprechender PCR-*primer* erzielt. Für eine besondere Studie (s. Kapitel *Generierung einer Translokationsbarriere*, S. 203) wurde durch geeignete PCR-*primer* eine *MspI*-Erkennungssequenz durch eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRV* (5'-GATATC-3') ersetzt.

Nachstehende Sequenz aus pBW201 liegt der Substrat-DNA der Sb157-Reihe zugrunde (fett hervorgehoben sind die methylierten Erkennungssequenzen von *M.MspI*, 5'-MCGG-3'). Die Sequenz wurde durch Verwendung der unten genannten PCR-*primer* an den unterstrichenen

Positionen zum Teil abgeändert und entspricht in ihrer hier gezeigten Form dem als Sb157-01.01 bezeichneten (*in vitro* methylierten) PCR-Produkt.

```

          10          20          30          40          50          60
5' - CCTGAAAATC TCGATAACTC AAAAAATACG CMCGGTAGTG ATCTTATTTTC ATTATGGTGA
3' - GGACTTTTAG AGCTATTGAG TTTTTTATGC GGGCMATCAC TAGAATAAAG TAATACCACT

          70          80          90          100          110          120
AAGTTGGAAC CTCTTACGTG CCGATCAACG TCTCATT TTC CCAAAGTT GGCCAGGGC
TTCAACCTTG GAGAATGCAC GGCTAGTTGC AGAGTAAAAG CGGTTTTCAA CCGGTCCCG

          130          140          150
TTCCMCGGTAT CAACAGGGAC ACCAGGATTT ATTTATT -3'
AAGGGCMATATA GTTGTCCCTG TGGTCCTAAA TAAATAA -5'

```

Nachfolgend aufgeführte DNA wurde in dieser Arbeit durch PCR unter Verwendung des templates pBW201 und den genannten *primern* (vgl. Kapitel *Verwendete primer für DNA-Generierung durch PCR*, S. 49) generiert, *in vitro* mit der Methyltransferase *M.MspI* methyliert, auf vollständige Methylierung überprüft und bei Erfolg aufgereinigt.

3.4.5.a. Sb157-00.00

primer 201h-MspG und 201r-CMsp,
vier Methylierungen,
keine Erkennungssequenz für McrBC.

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleiben zwar beide im *template* vorkommenden *MspI*-Erkennungssequenzen erhalten, liegen aber jeweils in der abgeänderten Sequenzumgebung 5'-CCCGGG-3', so dass sich jeweils vor den ersten, methylierbaren Cytosinresten der *MspI*-Erkennungssequenzen ein Pyrimidin befindet und sich aus der *M.MspI*-Methylierung keine McrBC-Erkennungssequenzen ergeben.

3.4.5.b. Sb157-01.01

primer 201-2hb und 201-2r
vier Methylierungen,
zwei Erkennungssequenzen für McrBC (Pos. 35/36, unterer Strang; Pos. 127/128, unterer Strang),

Orientierung der Erkennungssequenzen: gleichläufig (separiert durch 90 bp).

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleibt die Originalsequenz des templates pBW201 erhalten. Nach *M.MspI*-Methylierung besitzt die DNA die oben gezeigte Sequenz.

3.4.5.c. Sb157-01.Eco

primer 201-2hb und 201r-Eco

zwei Methylierungen,

eine Erkennungssequenz für McrBC (Pos. 35/36, unterer Strang),

EcoRV-Erkennungssequenz: 5' zur McrBC-Erkennungssequenz (separiert durch 89 bp).

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleibt die vordere der beiden im *template* vorkommenden *MspI*-Erkennungssequenzen (Pos. 32 bis Pos. 35) im Sequenzkontext von pBW201 erhalten, die hintere (Pos. 124 bis Pos. 127) wird jedoch durch Einfügen einer *EcoRV*-Erkennungssequenz (5'-GATATC-3', Pos. 126 bis Pos. 131) zerstört.

3.4.5.d. Sb157-10.01

primer 201h-AMspG und 201-2r

vier Methylierungen,

zwei Erkennungssequenzen für McrBC (Pos. 31/32, oberer Strang; Pos. 127/128, unterer Strang),

Orientierung der Erkennungssequenzen: gegenläufig (separiert durch 94 bp).

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleibt die hintere der beiden im *template* vorkommenden *MspI*-Erkennungssequenzen (Pos. 124 bis Pos. 127) im Sequenzkontext von pBW201 erhalten, bei der vorderen (Pos. 32 bis Pos. 35) wird jedoch die direkte Sequenzumgebung geändert (5'-ACCGGG-3', Pos. 31 bis 36), so dass die aus einer M.*MspI*-Methylierung resultierende McrBC-Erkennungssequenz aus dem unteren Strang entfernt, dafür eine im oberen Strang eingeführt wird.

3.4.5.e. Sb157-10.10

primer 201h-AMspG und 201CMspT

vier Methylierungen,

zwei Erkennungssequenzen für McrBC (Pos. 31/32, oberer Strang; Pos. 123/124, oberer Strang),

Orientierung der Erkennungssequenzen: gleichläufig (separiert durch 90 bp).

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleiben zwar beide im *template* vorkommenden *MspI*-Erkennungssequenzen erhalten, liegen aber beide in einer abgeänderten Sequenzumgebung (5'-ACCGGG-3', Pos. 31 bis 36, sowie Pos. 123 bis 128), so dass die aus einer M.*MspI*-Methylierung resultierenden McrBC-Erkennungssequenzen aus dem unteren Strang entfernt, dafür jeweils im oberen Strang eingeführt werden.

3.4.5.f. Sb157-10.Eco

primer 201h-AMspG und 201r-Eco

zwei Methylierungen,

eine Erkennungssequenz für McrBC (Pos. 31/32, oberer Strang).

EcoRV-Erkennungssequenz: 3' zur McrBC-Erkennungssequenz (separiert durch 93 bp).

Bemerkung: Durch die verwendeten *primer* bleibt die vordere der beiden im *template* vorkommenden *MspI*-Erkennungssequenzen (Pos. 32 bis Pos. 35) im abgeänderten Sequenzkontext 5'-ACCGGG-3' erhalten (durch die geänderte Sequenzumgebung wird die aus einer M.*MspI*-Methylierung resultierende

McrBC-Erkennungssequenz aus dem unteren Strang entfernt, dafür eine im oberen Strang eingeführt), die hintere (Pos. 124 bis Pos. 127) wird durch Einfügen einer *EcoRV*-Erkennungssequenz (5'-GATATC-3', Pos. 126 bis Pos. 131) zerstört.

3.4.6. Sb173

Das in dieser Arbeit hergestellte PCR-Produkt Sb173 ist eine methylierungsfreie DNA und somit kein Substrat für das Restriktionssystem McrBC. Die 173 bp große DNA wurde als Kontrolle für Experimente mit Sb234-DNA unter der Verwendung der *primer* Sb1Hin und Sb1Rück (s. S. 55) auf Basis des *templates* pMcrSb1 (s. S. 125) hergestellt. Damit ist Sb173 sequenzgleich mit Sb234-Molekülen, ihm fehlt aber die in beiden Sb234-Vertretern zentral gelegene methylierte Sequenz des in der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle liegenden Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11. Die DNA Sb173 hat folgende Sequenz (die *EcoRI*-Schnittstelle, 5'-G↓AATTC-3', ist kursiv hervorgehoben), die durch Sequenzierung überprüft wurde.

```

          10          20          30          40          50          60
          |           |           |           |           |           |
5' - TCATCACGAT  TCCAAACAGC  AAATTTATTT  GTAAATATAA  TTAAATCTAC  CATTGTGATC
3' - AGTAGTGCTA  AGGTTTGTCT  TTTAAATAAA  CATTATATAT  AATTTAGATG  GTAAACATAG

          70          80          90          100         110         120
          |           |           |           |           |           |
TTGTCATTGA  CTAAAGGGCT  ATGTAAACCA  AAAATGAAGA  ATCAATAAG  TTCTCTATTA
AACAGTAACT  GATTTCCCGA  TACATTTGGT  TTTTACTTCT  TAAGTTATTC  AAGAGATAAT

          130         140         150         160         170
          |           |           |           |           |
TACAATTTTA  AGTTTTCCCT  TAAAATTTTA  TCTGAGTTAG  GATGCTCTGC  AAT -3'
ATGTTAAAAT  TCAAAAGGAG  ATTTTAAAAT  AGACTCAATC  CTACGAGACG  TTA -5'

```

3.4.7. DNA der Sb234-Gruppe

Zwei in dieser Arbeit hergestellte, jeweils 234 bp große DNA-Moleküle sind unter der Bezeichnung Sb234 zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um annähernd sequenzgleiche PCR-Produkte, die durch Verwendung gleicher *primer*, aber unterschiedlicher *template*-Plasmide gewonnen wurden. Beide *template*-Plasmide sind Derivate des für die Herstellung des PCR-Produktes Sb173 verwendeten *templates* pMcrSb1 und tragen in dem jeweils amplifizierten Abschnitt zwei Erkennungssequenzen des Restriktions-/Modifikationssystems

MspI, die durch Ligation des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 in die einzige *EcoRI*-Schnittstelle von pMcrSb1 eingebracht wurden. Die Orientierung des Sequenzabschnittes von Sb61-11.11 ist in den beiden Sb234-DNAs unterschiedlich. Beide Sb234-Substrate wurden mit den auch für die Herstellung der Sb173-DNA verwendeten PCR-primern Sb1Hin und Sb1Rück (s. S. 55) hergestellt, *in vitro* mit *M.MspI* methyliert und aufgereinigt. Im Einzelnen handelt es sich um die folgenden beiden Substrate, die beide nach der einheitlichen Nomenklatur dieser Arbeit Sb234-11.11 heißen. Die Sequenzen beider Substrate wurden durch Sequenzierung überprüft.

3.4.7.a. Sb234a-11.11

Dieses PCR-Produkt basiert auf pMcrSb2 (s. S. 128) und trägt in der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle der Sequenz von Sb173 (s. S. 146) die Sequenz des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 in der bei der Beschreibung des Oligodesoxynukleotids gezeigten Orientierung (*a*; vgl. S. 134). Somit liegen zwischen dem linken Ende der DNA und der ersten Erkennungssequenz von McrBC (5'-AM-3') 108 bp (oberer Strang) bzw. 112 bp (unterer Strang), zwischen der zweiten McrBC-Erkennungssequenz und dem rechten Ende der DNA 84 bp (oberer Strang) bzw. 80 bp (unterer Strang). Zwischen beiden *in cis* liegenden Erkennungssequenzen von McrBC befinden sich, entsprechend der Sequenz von Sb61-11.11, jeweils 38 bp. Die Sequenz von Sb234a-11.11 entspricht dem bei der Beschreibung von pMcrSb2 gezeigten PCR-Produkt, das im Rahmen der Sequenzierung von pMcrSb2 entstand (vgl. S. 130).

3.4.7.b. Sb234b-11.11

Dieses PCR-Produkt basiert auf pMcrSb3 (s. S. 128) und trägt in der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle der Sequenz von Sb173 (s. S. 146) die Sequenz des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 in einer im Vergleich zu Sb234a-11.11 entgegengesetzten Orientierung (*b*). Durch die umgekehrte Lage der asymmetrischen Sb61-Sequenz im Sequenzkontext des PCR-Produktes vergrößern sich die Abstände der McrBC-Erkennungssequenzen zum linken Ende der DNA im Vergleich zu Sb234a-11.11 um ein Basenpaar, und verringern sich entsprechend zum rechten DNA-Ende um den gleichen Betrag.

3.4.8. Sb637-00.10.01.01

Die 637 bp große DNA Sb637 ist ein PCR-Produkt, das in dieser Arbeit durch Verwendung der unmethylierten *primer* Sb1Hin (s. S. 55) und 201-1r (fügt eine *EcoRI*-Schnittstelle ein;

s. S. 50) auf Grundlage des *templates* pBW201 (Pos. 4756 bis 539 der im Anhang gezeigten Sequenz von pBW201, s. S. 282) hergestellt wurde. Das PCR-Produkt enthält vier Erkennungssequenzen von *MspI*. Diese sind im *template* pBW201 an den Positionen 6 bis 9, 48 bis 51, 267 bis 270 und 359 bis 362 zu finden und befinden sich in dem Substrat Sb637 an den Positionen 104 bis 107, 146 bis 149, 365 bis 368 und 457 bis 460. Das in dieser Arbeit hergestellte PCR-Produkt wurde *in vitro* mit der Methyltransferase *M.MspI* methyliert und aufgereinigt. Die aus vollständiger Methylierung mit *M.MspI* entstehende DNA enthält trotz dem Vorhandensein von insgesamt acht Methylierungen nur drei Erkennungssequenzen für das Restriktionssystem *McrBC*. Aus der ersten *M.MspI*-Erkennungsstelle ergeben sich nur Sequenzen der Art 5'-TM-3' (mit M = 5-Methylcytosin), die zweite ergibt eine *McrBC*-Erkennungssequenz in Form von 5'-GM-3' im oberen DNA-Strang (der untere enthält hier 5'-TM-3'), die dritte und vierte *M.MspI*-Erkennungssequenz ergeben jeweils eine *McrBC*-Erkennungssequenz in Form von 5'-AM-3' im unteren Strang und 5'-CM-3'-Sequenzen im oberen Strang. Der für die einheitliche Benennung der PCR-Produkte richtige Name ist demnach Sb637-00.10.01.01, da aber im Rahmen dieser Arbeit keine entsprechenden Variationen dieses PCR-Produkts hergestellt wurden, wird der Substratname hier mit Sb637 abgekürzt.

Die *McrBC*-Erkennungssequenzen liegen in diesem Substrat also an den Positionen 145/146 (5'-AM-3' im oberen Strang), 368/369 (5'-GM-3' im unteren Strang) und 460/461 (5'-GM-3' im unteren Strang). Das methylierte Cytosin-Nukleotid (5-Methylcytidin) der ersten *McrBC*-Erkennungssequenz wird durch 145 bp vom vorderen DNA-Ende und 221 bp vom nächsten Methylcytosin getrennt. Zwischen dem zweiten und dem dritten Methylcytosin liegen 91 bp, zwischen dem dritten und dem hinteren DNA-Ende 177 bp.

4. Untersuchungen zur DNA-Bindung

Als ein mit DNA interagierendes System besitzt das *McrBC*-Restriktionssystem die Fähigkeit, an DNA zu binden und darüber hinaus spezifisch modifizierte DNA-Substrate hydrolytisch spalten zu können. Hier nun wurde die Eigenschaft des *McrBC*-Systems, an verschiedene DNA-Substrate binden zu können, durch Anwendung unterschiedlicher Analysemethoden untersucht. Der Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen erfolgte mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden in sog. Gelretardationsexperimenten (*mobility-shift-*

Gele), durch optische Verfahren (Rasterkraft-Mikroskopie) und durch Messungen der Oberflächen-Plasmonresonanz in BIAcore-Instrumenten. Die mit diesen Methoden erzielten Ergebnisse sollen im Folgenden vorgestellt werden.

4.1. Gelretardationsexperimente

Die in dieser Arbeit durchgeführten Gelretardationsexperimente sind Untersuchungen zur Bestimmung von DNA-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe der *mobility-shift*-Gelelektrophorese. Dabei wird ausgenutzt, dass DNA-Protein-Komplexe bei einer unter bestimmten Bedingungen stattfindenden Elektrophorese stabil sind (sog. "Gelkäfig"-Effekt, vgl. S. 79) und ein anderes Laufverhalten im Elektrophorese-Gel zeigen als freie DNA. In der Regel ist die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Protein-Komplexen in *mobility-shift* Gelen kleiner als die der freien DNA, so dass die Komplexe während der Elektrophorese gegenüber der freien DNA im Gel zurückbleiben. Diese Retardation der Komplexe führt bei einem Nachweis der DNA im Elektrophorese-Gel zu Banden mit einer im Vergleich zur freien DNA verschobenen Position (sog. *shift*-Banden). Durch die Bindung von Proteinen an DNA-Sequenzen können auch DNA-Protein-Komplexe entstehen, denen es aufgrund ihrer Größe nicht mehr möglich ist, während der Elektrophorese in das *mobility-shift*-Gel einzuwandern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit beispielsweise für die Bindung von McrB an Sb234-DNA (vgl. S. 146) beobachtet. Die *in vitro* durch M.*MspI* methylierten PCR-Produkte besitzen eine Länge von 234 bp und tragen im zentralen Abschnitt zwei McrBC-Erkennungselemente (mit je zwei McrBC-Erkennungssequenzen; vgl. S. 28). Die Inkubation von etwa 100 ng Sb234a-11.11 bzw. Sb234b-11.11 mit 5 μ M McrB (als GST-Fusionsprotein) in HMD-Puffer mit Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin für 15 min bei 0 °C führt zu spezifischen DNA-Protein-Komplexen, die nicht mehr in ein *mobility-shift*-Gel, das 6 % Polyacrylamid enthält, einwandern können. Die Tatsache, dass die beiden mit McrB inkubierten DNA-Substrate nicht in das Gel einwandern können, ist kein Effekt der Methylierung an sich, da die entsprechende freie DNA problemlos während der Elektrophorese in das Gel eindringen kann. Ein Bindungsansatz mit nichtmethyliertem Sb234 führt nicht zu einem im Vergleich zur freien DNA veränderten Laufverhalten der so vorbehandelten DNA im *mobility-shift*-Gel. Das gleiche Ergebnis wird erzielt, wenn Sb173 als Substrat in einem entsprechenden Bindungsansatz verwendet wird. Diese DNA enthält keine Erkennungssequenzen von *MspI* und dementsprechend auch nach Inkubation mit M.*MspI* und SAM keine McrBC-Erkennungselemente (vgl. S. 146). Sb173-DNA läuft sowohl unabhängig davon, ob sie zuvor

wie Sb234 der Prozedur der *in-vitro*-Methylierung mit anschließender Aufreinigung unterzogen wurde, als auch unabhängig davon, ob sie wie oben beschrieben mit McrB in einem Bindungsansatz inkubiert wurde, stets gleich weit in das *mobility-shift*-Gel ein. Diese Kontrollexperimente zeigen, dass die veränderten Wanderungseigenschaften spezifisch methylierter Sb234-DNA nach Inkubation mit McrB ausschließlich auf spezifische Bindung der McrB-Proteine an diese DNA und möglicherweise zusätzlich auf einer damit verbundenen Bildung höhermolekularer Komplexe zurückzuführen ist. Mit den DNA-Substraten Sb173 und Sb234a-11.11 konnte keine methylierungsspezifische Bindung der isolierten McrC-Untereinheit an DNA gezeigt werden.

4.1.1. Sb61-11.11

Die spezifische Bindung der McrB-Untereinheit des McrBC-Restriktionssystems an DNA wurde mit dem Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 näher untersucht. Diese 61 bp lange DNA enthält zwei McrBC-Erkennungselemente (vgl. S. 28), die jeweils in beiden DNA-Strängen die Sequenz 5'-AM-3' (M = 5-Methylcytosin) besitzen (vgl. S. 134). Mit der *mobility-shift*-Methode wurden in ihrer Länge unterschiedliche N- bzw. C-terminal verkürzte Varianten der McrB-Untereinheit in Bezug auf ihre Fähigkeit, diese DNA spezifisch zu binden, untersucht (vgl. Abbildung 10).

Wie in Abbildung 10 gezeigt, wird das verwendete DNA-Substrat bei einer Konzentration von 1 μ M im Bindungsansatz komplett durch McrB gebunden, so dass keine freie DNA in der betreffenden Gelbahn (linkes Autoradiogramm, ganz rechts) zu erkennen ist. Die Entstehung einer durch die DNA-Bindung durch McrB sehr verschwommenen *shift*-Bande im Gel wurde auch mit anderen DNA-Substraten beobachtet (Gast *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu vermag der carboxyterminale Teil des McrB-Proteins, McrB_s (McrB₁₆₉₋₄₆₅), die DNA nicht zu binden (linkes Autoradiogramm, zweite Bahn), die DNA liegt ausschließlich als freie DNA vor (linkes Autoradiogramm, erste Gelbahn). Dieser Effekt geht nicht auf eine falsch gefaltete Proteinstruktur zurück, was von U. Pieper (Gießen) durch CD- (Zirkulardichroismus, *circular dichroism*) spektroskopische Messungen und Bestimmung der GTPase-Aktivität gezeigt wurde (Pieper *et al.*, 1999b). Die Fähigkeit zur spezifischen DNA-Bindung ist im McrB-Protein in dem aminoterminalen Abschnitt lokalisiert, was mit entsprechenden McrB-Varianten gezeigt werden konnte (rechtes Autoradiogramm in Abbildung 10). Die dafür verwendeten GST-Fusionsproteine besitzen von McrB nur die ersten 162 Aminosäurereste (McrB₁₋₁₆₂), die ersten 170 (McrB₁₋₁₇₀) bzw. die ersten 190 Aminosäurereste (McrB₁₋₁₉₀) und

zeigen spezifische Bindung des Substrats Sb61-11.11, die zu unterschiedlichen *shift*-Banden im Gel führt. Die längste Variante, McrB₁₋₁₉₀, bildet einen größeren Anteil an Komplexen, die im Gel langsamer laufen, während die Komplexe der kürzeren Variante, McrB₁₋₁₆₂, im Gel vergleichsweise schneller laufen als die DNA-McrB₁₋₁₉₀-Komplexe. Dass jede der untersuchten N-terminalen Domänen von McrB mehrere (mindestens zwei) unterschiedliche *shift*-Banden im Gel bildet, ist auf eine unterschiedliche Anzahl der an das DNA-Substrat gebundenen McrB-Varianten zurückzuführen. Auffällig ist, dass die im Gel sichtbaren *shift*-Banden zweier N-terminaler Varianten bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen nicht auf einer Höhe liegen. Mit steigender Konzentration von McrB₁₋₁₇₀ sowie von McrB₁₋₁₉₀ werden die DNA-Protein-Komplexe im Gel langsamer. Diese Beobachtung wurde sowohl mit anderen hier verwendeten DNA-Substraten gemacht, wie Sb128-11.11, als auch mit weiteren Substraten (Wünsch, 2000), und soll später diskutiert werden.

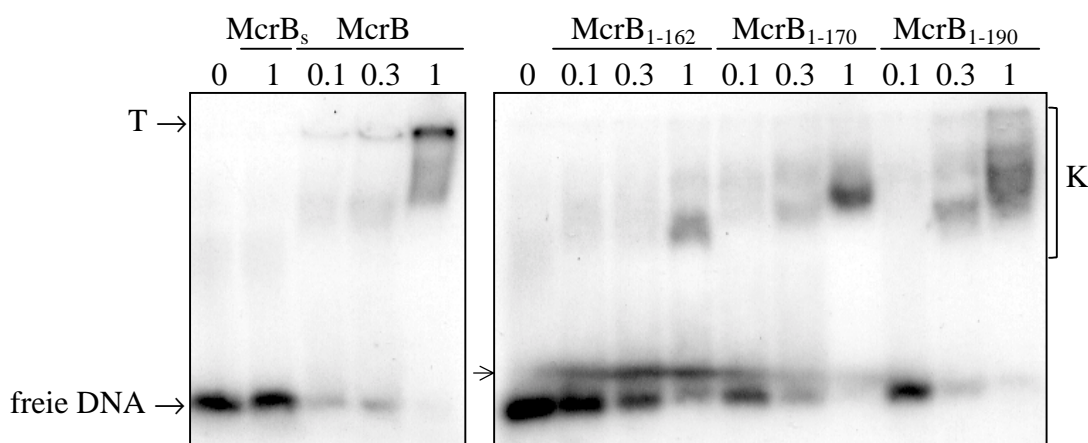


Abbildung 10: Spezifische Bindung unterschiedlicher Varianten der Untereinheit McrB an Substrat-DNA Sb61-11.11.

Die Abbildung zeigt zwei *mobility-shift*-Gele (6 % PAA), in denen die Position der radioaktiv markierten DNA autoradiografisch nachgewiesen wurde. Die 15 min bei 0 °C inkubierten Bindungsansätze zu je 10 μ l enthielten unterschiedliche Mengen verschiedener Varianten der McrB-Untereinheit und 0.1 μ M DNA-Substrat Sb61-11.11 in HMD-Puffer, der Zusätze von 200 μ g \cdot ml⁻¹ BSA und 10 % (v/v) Glycerin enthielt. Die Zahlen über den Gelbahnen bezeichnen die im Bindungsansatz vorhandene Konzentration (Einheit μ M) der jeweils darüber angegebenen McrB-Variante; linkes Gelbild: McrB_s (McrB₁₆₉₋₄₆₅) und McrB (vgl. Kapitel *Einleitung*); rechtes Gelbild: isolierte N-terminale Domänen von McrB, bestehend aus den Aminosäurereste 1 bis 162 (McrB₁₋₁₆₂), 1 bis 170 (McrB₁₋₁₇₀) bzw. 1 bis 190 (McrB₁₋₁₉₀). Am linken Rand ist die Position der Böden der Gel-Auftragstaschen (T) sowie die der freien DNA im Gel markiert. Die Klammer am rechten Rand der Abbildung zeigt die Lage der DNA-Protein-Komplexe im Gel an (K). Der kleine Pfeil zwischen den beiden Gelbildern weist auf eine linienförmige Schwärzung des Röntgenfilms hin, die durch eine Kontamination der Röntgenfilmkassette, und nicht, wie Messungen mit dem *Instant Imager* bestätigten, durch die Radioaktivität der verwendeten DNA und somit unabhängig vom Experiment erfolgte.

4.1.2. Sb128-DNA

Die zu der Sb128-Gruppe gehörenden DNA-Moleküle sind 128 bp lang und unterscheiden sich in ihrem Muster an McrBC-Erkennungssequenzen, das sie durch unterschiedliche Methylierung der identischen Sequenz besitzen (vgl. S. 141). Die DNA-Substrate Sb128-00.00, Sb128-10.00 und Sb128-10.01 wurden für eine Überprüfung der unspezifischen bzw. spezifischen DNA-Bindung durch McrB mit der *mobility-shift* Methode verwendet. Hierzu wurden 0.1 μM DNA mit bis zu 8 μM GST-McrB in einem Bindungsansatz mit 10 mM MgCl_2 inkubiert (vgl. S. 104) und mit einem *mobility-shift*-Gel elektrophoretisch analysiert. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid zeigte sich für alle Substrate eine Bindung durch McrB bei höheren McrB-Konzentrationen. Das zwei McrBC-Erkennungssequenzen tragende Sb128-10.01 wird, ebenso wie das nur eine McrBC-Erkennungssequenz besitzende Sb128-10.00 bei einer Konzentration von 4 μM McrB fast quantitativ durch McrB gebunden. Dieser Zustand wird für das unmethylierte Sb128-00.00 erst bei einer McrB-Konzentration von 8 μM erreicht, während es bei einer Konzentration von 4 μM McrB noch zu 50 % als freie DNA vorliegt. Dies zeigt, dass die spezifische Bindung dieser DNA nicht in einem deutlich stärkere Maße erfolgt als die unspezifische Bindung. Trotzdem führen nur Bindungsereignisse des McrBC-Systems an spezifische methylierte Sequenzen dieser Sb128-Moleküle zu einer Spaltung der Substrate (vgl. S. 205). Die Analyse der durch die spezifischen und unspezifischen Bindungsereignisse entstehenden DNA-Protein-Komplexe wird durch die unvollständige Einwanderung dieser Komplexe in die verwendeten Gelsysteme erschwert. Das Bindungsverhalten von McrB an die Substrate der Sb218-Gruppe wurde deshalb mit Hilfe von BIAcore-Instrumenten näher untersucht (s. S. 155).

4.2. Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie ist ein Verfahren zur optisch vergrößerten Darstellung von Makromolekülen. Die hierbei erhaltene Darstellung der Moleküle ist jedoch kein reelles Abbild, sondern ein mit Hilfe eines Computers erzeugtes Falschfarbenbild des Oberflächenprofils der Vorlage. Die Oberfläche der Probe wird dabei durch das Rasterkraftmikroskop (*scanning force microscope*, SFM) mit Hilfe einer extrem dünnen Nadel abgetastet (vgl. S. 110). Durch die indirekte, auf einer Abtastung des zu betrachtenden Objekts beruhende Erzeugung der Abbildung ist das Verfahren mit einer großen Palette möglicher Fehlerquellen behaftet, die zum Einen die Entstehung des Bildes betreffen, zum

Anderen aber auch dessen Interpretation. So erlauben die erhaltenen Aufnahmen nicht ohne weiteres eine Unterscheidung zweier ähnlich großer Proteine mit jeweils globulärer Struktur. Gleiches gilt auch für die Unterscheidung von erhaltenen Proteinkomplexen und Kontaminationen, so dass entsprechende Kontrollaufnahmen unerlässlich sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem DNA-Substrat durchgeführt, das aufgrund seiner Asymmetrie die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungsereignissen bezüglich des McrBC-Systems ermöglichen sollte. Es handelt sich hierbei um auf Seite 131) vorgestellte DNA-Substrat Pf1793-11.10, das zwei deutlich getrennte McrBC-Erkennungselemente enthält (vgl. S. 28). In Abbildung 11 (s. S. 155) sind einige der im Rahmen dieser Arbeit produzierten SFM-Aufnahmen gezeigt. Die Aufnahme A) zeigt ein einzelnes Substratmolekül Pf1793-11.10. Die gezeigte Aufnahme stammt aus einer SFM-Betrachtung der verwendeten DNA-Präparation (3 nM Pf1793-11.10) ohne Zugabe von Proteinen, die für eine Überprüfung des verwendeten Substrats angefertigt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass die DNA-Präparation ausreichend frei von Kontaminanten war und im Wesentlichen aus DNA einheitlicher Länge (ca. 600 nm) bestand. Eine Inkubation der DNA (2.5 nM Pf1793-11.10) mit geringen Konzentrationen an McrB (3 nM GST-McrB) führte zu Bildern, wie sie unter B) gezeigt sind. Viele, aber nicht alle DNA-Moleküle zeigten sich nach dieser Inkubation mit globulären Strukturen, die auch in Kontrollaufnahmen der verwendeten McrB-Präparation zu finden waren. Bei den an die DNA assoziierten Strukturen handelt es sich höchstwahrscheinlich um substratgebundenes McrB. Diese Annahme resultiert aus der Vermessung der Position der globulären Strukturen an den DNA-Molekülen, die sich nahezu einheitlich in einem Entfernungsverhältnis von 3 : 1 zu beiden DNA-Enden befinden. In gleicher relativer Lage befindet sich eines der beiden McrBC-Erkennungselemente von Pf1793-11.10 (vgl. Abbildung 11 E). Dieses Element besteht, im Unterschied zu dem zweiten, das nur eine singuläre McrBC-Erkennungssequenz enthält, aus zwei McrBC-Erkennungssequenzen (vgl. Schemazeichnung von Pf1793-11.10 auf S. 132). Die Interpretation der erhaltenen SFM-Bilder ist, dass bei diesen Konzentrationen an McrB das Protein spezifisch an das erste McrBC-Erkennungselement von Pf1793 bindet. Unspezifische Bindung von McrB an die Substrat-DNA oder spezifische Bindung an das zweite McrBC-Erkennungselement wird, sofern sie während der Inkubation des Bindungsansatzes ausgebildet wurde, offensichtlich durch die Vorbereitung der im SFM zu betrachtenden Probe zerstört und zeigt sich daher nicht in diesen Aufnahmen. Eine Erhöhung der McrB-Konzentration auf 9 nM GST-McrB im Bindungsansatz mit 2.5 nM Pf1793-11.10 führte bei der Betrachtung mit dem SFM zu

Bildern, wie eines beispielhaft in Abbildung 11 C) gezeigt ist. Viele DNA-Moleküle wiesen hier zwei getrennte globuläre Strukturen etwa gleicher Größe auf. Auch bei diesen Molekülen führte die Vermessung der relativen Lage der globulären Strukturen am DNA-Substrat zu Werten, die der relativen Lage der McrBC-Erkennungssequenzen in Pf1793-11.10 entsprechen. Die Abstände vom linken Ende von Pf1793-11.10 zum ersten McrBC-Erkennungselement, von diesem Element zum zweiten, und vom zweiten zum rechten Ende der DNA entsprechen einem Verhältnis von 7.5 : 1.5 : 1 (vgl. Abbildung 11 E). Die angefertigten SFM-Aufnahmen vermögen jedoch keine Auskunft darüber zu geben, wie viele McrB-Proteine an der Ausbildung einer solchen, an einer spezifischen Bindungsstelle von McrB befindlichen Struktur beteiligt sind.

In Abbildung 11 D gezeigt sind SFM-Aufnahmen, die nach Inkubation der Substrat-DNA Pf1793-11.10 (2.5 nM) mit McrB und McrC (jeweils 9 nM) in Anwesenheit von GTP (1 mM) entstanden. Die sich hier an der DNA zeigenden Strukturen sind deutlich größer als sie aus Inkubation der DNA mit McrB hervorgingen (Abbildung 11 B und C). Auffällig ist, dass die mit solchen großen Strukturen assoziierte DNA in unterschiedlichem Ausmaß als freie DNA zu erkennen ist. Die DNA Pf1793-11.10 ist zwar ein Substrat, welches durch das McrBC-System gespalten werden kann (vgl. S. 131), aber aus den hier gegebenen Inkubationsbedingungen ist keine DNA-Spaltung durch McrBC zu erwarten. Demnach sind die Abschnitte von Pf1793-11.10, die in den SFM-Aufnahmen nicht als freie DNA zu erkennen sind, Bestandteil der großen globulären Strukturen. Ob es sich hierbei jedoch tatsächlich um spezifische McrBC-DNA-Komplexe handelt, wie vermutet werden kann, ist unklar. Für weitergehende Aussagen über die Spezifität oder die Zusammensetzung der sich hier zeigenden großglobulären Strukturen an der DNA fehlen Kontrollaufnahmen mit einem entsprechenden unmethylierten (unspezifischen) DNA-Substrat. Diese konnten aufgrund des zeitlich sehr eingeschränkten Aufenthalts im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, wo die Aufnahmen in der Abteilung *Biophysik der Makromoleküle* unter Anleitung von N. Mücke angefertigt wurden, nicht durchgeführt werden.

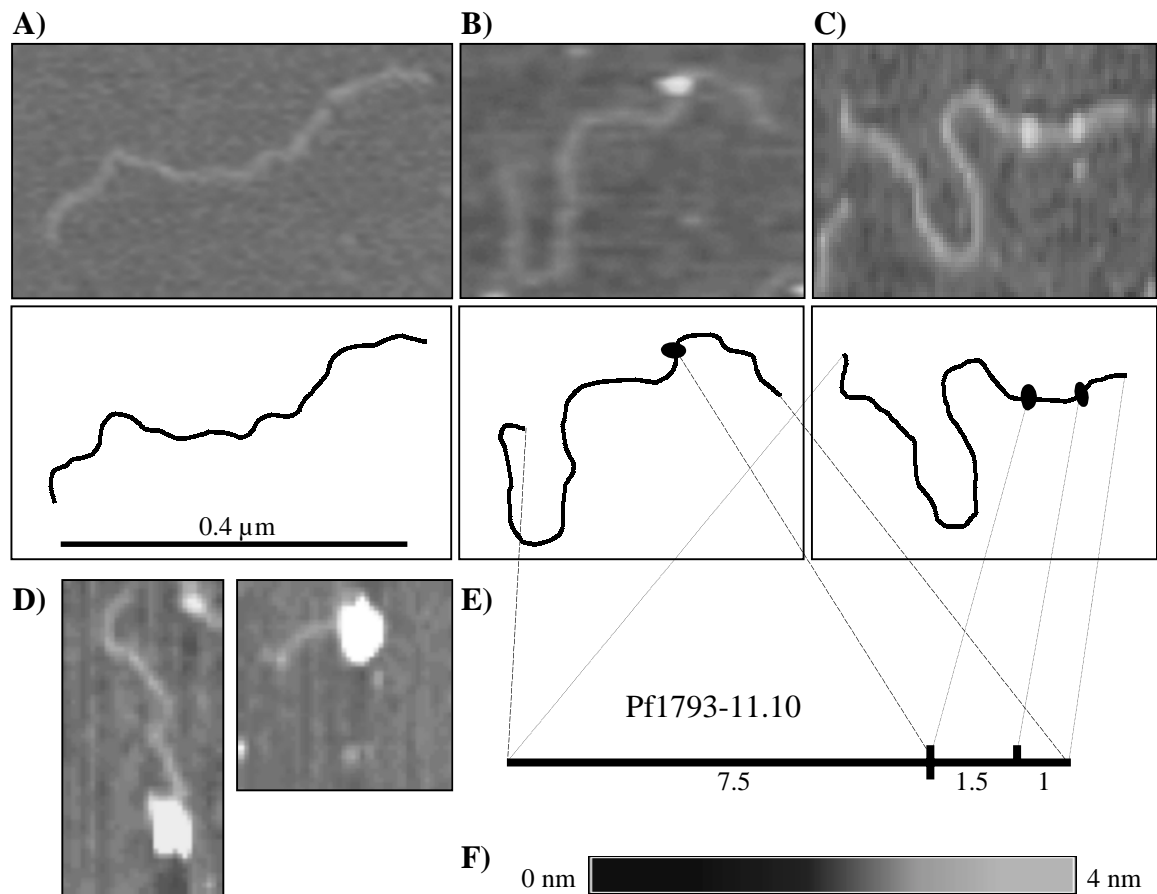


Abbildung 11: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der DNA-Bindung durch McrB und McrBC.

Die Graustufen der mit dem SFM im *tapping*-Modus erzeugten Aufnahmen entsprechen den unter F) skalierten Erhebungen der vermessenen Oberfläche. Die Aufnahmen A) bis C) zeigen die Bindung von McrB an das Substratmolekül Pf1793-11.10 mit steigender Konzentration an McrB. Unter den Aufnahmen skizziert ist die Lage der in den jeweiligen Aufnahmen zu erkennenden DNA (schwarze Linie) und der an die DNA gebundenen McrB-Proteine (schwarze Ellipsen). In E) ist Pf1793-11.10 als schwarzer Balken symbolisiert, an dem die Positionen der nach oben bzw. nach unten zeigenden kurzen Balken die relative Lage der McrBC-Erkennungssequenzen im oberen bzw. in unteren DNA-Strang anzeigen (vgl. Schemazeichnung von Pf1793-11.10 auf S. 132). Die Positionen der in den Aufnahmen gezeigten McrB-Bindung an Pf1793-11.10 stimmen mit der Lage der McrBC-Erkennungselemente in Pf1793-11.10 überein, wie durch entsprechende Verbindungen mit dünnen bzw. gestrichelten Linien symbolisiert wird. Die Zuordnung der Bindungsstellen erfolgte durch Vermessen der relativen Abstände der an die DNA gebundenen Proteine zueinander bzw. zu den Enden des Substratmoleküls und anschließenden Vergleich mit den relativen Abständen der McrBC-Erkennungssequenzen zueinander bzw. zu den Enden von Pf1793-11.10, die in Abb. E) angegeben sind (relative Gesamtlänge von Pf1793 = 10). Die unter D) gezeigten Aufnahmen entstanden nach Inkubation von Pf1793-11.10 mit McrB und McrC. Der in der Skizze von Abb. A) gezeigte Größenmaßstab gilt für alle hier gezeigten Aufnahmen. Näheres zu den Aufnahmen siehe Text.

4.3. Untersuchungen mit BIAcore-Instrumenten

Durch Verwendung von BIAcore-Instrumenten können u. a. Protein-DNA-Wechselwirkungen direkt beobachtet werden, indem über Messung der Oberflächen-Plasmonresonanz

die Massenänderung an einer Oberfläche, an die einer der Bindungspartner gekoppelt ist, grafisch dargestellt wird (s. S. 105). In dieser Arbeit wurden auf diese Weise Studien über die Wechselwirkung des McrBC-Restriktionssystems unter verschiedenen Bedingungen mit verschiedenen modifizierten DNA-Substraten angefertigt.

Für einen Satz an Experimenten wurde hierfür DNA der Sb128-Gruppe verwendet (vgl. S. 141), die über jeweils eine in den Molekülen 5'-ständige Biotingruppe an die streptavidinbeschichtete Oberfläche des Sensorchips gekoppelt wurde. An die 1 mm² großen Oberflächen der vier in Reihe schaltbaren Durchflusszellen (*flow cells*, FC; in ihrer Reihenfolge nummeriert von 1 bis 4) wurden jeweils 200 pg der DNA-Substrate Sb128-00.00 (enthält keine McrBC-Erkennungssequenz; FC 2), Sb128-00.01 (enthält eine McrBC-Erkennungssequenz; FC 3) und Sb128-10.01 (enthält zwei durch 66 bp separierte McrBC-Erkennungssequenzen; FC 4) immobilisiert. An die Oberfläche einer Messzelle (FC 1) wurde für die Beobachtung unspezifischer Effekte und zur Aufnahme von Referenzwerten keine DNA gekoppelt. Der so vorbereitete Sensorchip wurde für Bindungsstudien mit McrB₁₋₁₆₂, McrB bzw. McrC verwendet, die in Anwesenheit von unspezifischer Kompetitor-DNA durchgeführt wurden (vgl. Kapitel *Oberflächen-Plasmonresonanz*, S. 105).

4.3.1. McrB₁₋₁₆₂

Die aus den ersten 162 Aminosäureresten von McrB bestehende, isoliert exprimierte aminoternale Domäne der McrB-Untereinheit der Restriktionsendonuklease McrBC, McrB₁₋₁₆₂ (als GST-Fusionsprotein), besitzt die Fähigkeit der McrBC-Nuklease, die DNA-Sequenz 5'-RM-3' (mit M = 5-Methylcytosin) spezifisch zu binden (vgl. Kapitel *Gelretardationsexperimente*, S. 149). Abbildung 12 zeigt die mit dem BIAcore-Instrument aufgenommenen Bindungs- und Dissoziationskurven dieser Variante von McrB. Die Bindungskurven von 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 µM McrB₁₋₁₆₂ wurden über einen Zeitraum von jeweils 120 s aufgenommen (beginnend in den in Abbildung 12 gezeigten Sensorgrammen jeweils zu dem mit einem weißen Pfeil, endend zu dem mit einem schwarzen Pfeil markierten Zeitpunkt). Die in den Sensorgrammen gezeigten Änderungen des Resonanz-Signals mit der Zeit in der Einheit *resonance unit* (RU) sind Differenzwerte zu den für das unspezifische Substrat Sb128-00.00 erhaltenen Messwerten und zeigen somit nur die Massenänderungen an den Messoberflächen an, die durch die Methylierungen der Substrate Sb128-00.01 (linkes Sensorgramm in Abbildung 12) bzw. Sb128-10.01 (rechtes Sensorgramm) hervorgerufen

werden. Die gezeigten Bindungsstudien von McrB₁₋₁₆₂ wurden in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ durchgeführt.

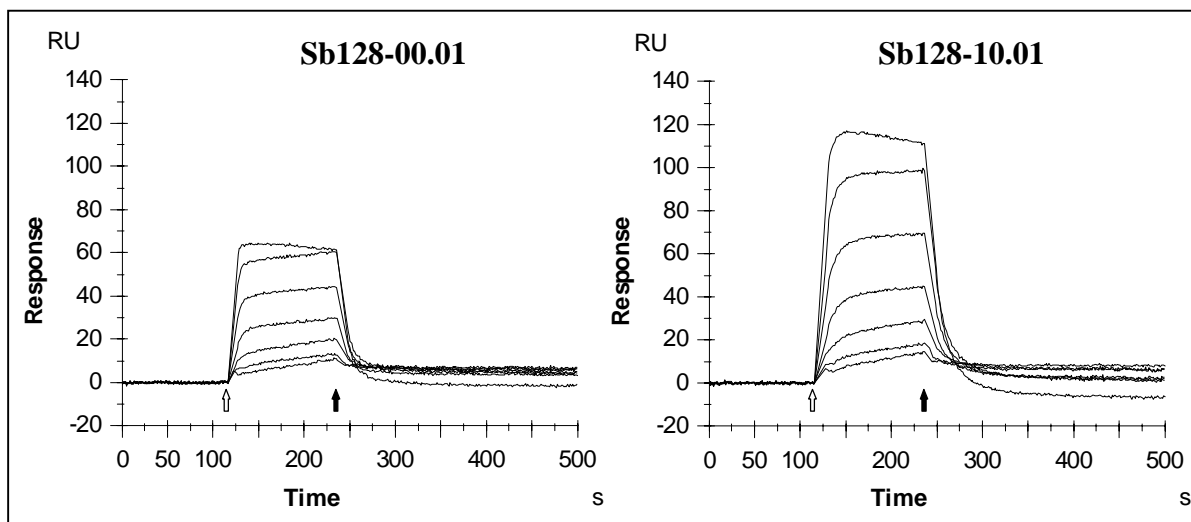


Abbildung 12: Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen DNA-Bindung durch McrB₁₋₁₆₂.

Die Sensorgramme zeigen die spezifische DNA-Bindung von unterschiedlichen Konzentrationen an McrB₁₋₁₆₂ an die 128 bp großen DNA-Substrate Sb128-00.01 (linkes Sensorgramm) bzw. Sb128-10.01 (rechtes Sensorgramm) im Vergleich zu Sb128-00.00, die jeweils über eine 5'-Biotinylierung (vgl. S. 141) an den streptavidinbeschichteten Sensorchip SA des BIAcore-Instruments immobilisiert wurden. Die bei den Messungen verwendeten McrB₁₋₁₆₂-Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 µM, deren Injektion in die Flusszellen des Sensorchips jeweils zu den durch weiße Pfeile angezeigten Zeiten begann, ergeben in dieser Reihenfolge die in beiden Sensorgrammen gezeigten Messkurven zunehmender *Response*-Werte. Nach 120 s, angezeigt durch schwarz ausgefüllte Pfeile, wurde jeweils die Injektion von McrB₁₋₁₆₂ beendet. Näheres siehe Text.

Wie Abbildung 12 zeigt, ergibt sich für beide spezifischen Substrate (Sb128-00.01 bzw. Sb128-10.01) ein mit steigender Konzentration an McrB₁₋₁₆₂ zunehmender Massenzuwachs während der Assoziationszeit des Proteins, der sehr schnell beginnt. Dabei ist zu beobachten, dass der erhaltene Massenzuwachs bei Verwendung von Sb128-10.01, einem Substrat mit zwei getrennten McrBC-Erkennungssequenzen, bei jeweils gleichen Konzentrationen an McrB₁₋₁₆₂ doppelt so stark ist, wie bei Verwendung des Substrats Sb128-00.01, das nur eine Erkennungssequenz des McrBC-Systems enthält. Dies zeigt, dass die Interaktion der McrB₁₋₁₆₂-Proteine an beiden McrBC-Erkennungssequenzen von Sb128-10.01 unabhängig voneinander erfolgt.

Eine Extrapolation der in Abbildung 12 gezeigten Messwerte der Bindung von McrB₁₋₁₆₂ ergibt einen Sättigungswert für das nur eine McrBC-Erkennungssequenz enthaltende DNA-Substrat Sb128-00.01 von etwa 80 RU, für das zwei getrennte McrBC-Erkennungssequenzen

enthaltende Substrat Sb128-10.01 von ungefähr 150 bis 160 RU. Damit erlauben die für verschiedene Konzentrationen an McrB₁₋₁₆₂ erhaltenen Bindungskurven eine Aussage darüber, wieviele Moleküle von McrB₁₋₁₆₂ maximal an eine McrBC-Erkennungssequenz binden. Dies ist möglich, da die Änderung des Resonanzsignals weitestgehend unabhängig von der Art der sich ändernden Masse an der Messoberfläche des BIAcore-Instruments erfolgt (vgl. Kapitel *Oberflächen-Plasmonresonanz*, S. 105). So verursachte die hier zuvor durchgeführte Kopplung von 200 pg DNA an die Messoberfläche einer Sensorzelle eine Änderung des Resonanzsignals von 200 RU (zur Definition der Einheit *RU* s. S. XIV). Die 128 bp langen Sb128-Substrate besitzen ein Molekulargewicht von ca. 84.45 kDa, das somit um den Faktor ~ 1.85 größer ist als das der McrB-Variante McrB₁₋₁₆₂ (ca. 45.53 kDa). Daraus folgt, dass eine gesättigte spezifische Bindung von McrB₁₋₁₆₂ an Sb128-00.01 im Verhältnis von 1 : 1 erreicht ist, wenn ein Massenzuwachs erhalten wurde, der um etwa den Faktor 1.85 kleiner ist als der durch die Immobilisierung der DNA erhaltene Wert von 200 RU. Dies ergibt rechnerisch einen Wert von ca. 108 RU. Eine große Anzahl an derartigen Messungen mit bekannten Protein-DNA-Interaktionen hat jedoch gezeigt, dass der für die Bindung von Proteinen an DNA erhaltene Wert um den Faktor 0.73 kleiner ist als der theoretisch berechnete (pers. Mitteilung von C. Speck, MPI für Molekulare Genetik, Berlin). Unter Berücksichtigung dieses empirisch ermittelten Korrekturfaktors ist eine im Mengenverhältnis von 1 : 1 vorliegende Interaktion von McrB₁₋₁₆₂ und Sb128-DNA erreicht, wenn der gemessene Massenzuwachs ca. 78 RU entspricht. Entsprechend bedeutet eine Änderung von ca. 155 RU die Bindung von zwei Molekülen McrB₁₋₁₆₂ pro DNA-Molekül der Art Sb128. Die oben extrapolierten Werte maximaler Bindung von McrB₁₋₁₆₂ an die Substrate stimmen gut mit diesen Werten überein. Damit zeigen die Messungen, dass pro McrBC-Erkennungssequenz der verwendeten Substrate *ein* Protein McrB₁₋₁₆₂ gebunden wird. Eine Di- oder Oligomerisierung von McrB₁₋₁₆₂ an den McrBC-Erkennungssequenzen der verwendeten Substrate kann ausgeschlossen werden. Damit unterscheidet sich das DNA-Bindungsverhalten der kurzen McrB-Variante McrB₁₋₁₆₂ von dem des McrB-Proteins voller Länge (s. u.).

Die Auswertung der erhaltenen Bindungs- und Dissoziationskurven von McrB₁₋₁₆₂ mit den spezifischen Sb128-Substraten über die Software BIAevaluation 3.0 (Fa. Biacore, Uppsala, Schweden) ergibt nach einer Anpassung der Daten nach dem Langmuir-Modell, das eine Wechselwirkung zwischen Molekülen im Verhältnis 1 : 1 beschreibt, eine Dissoziationskonstante für McrB₁₋₁₆₂ von etwa 7 bis 10 μ M.

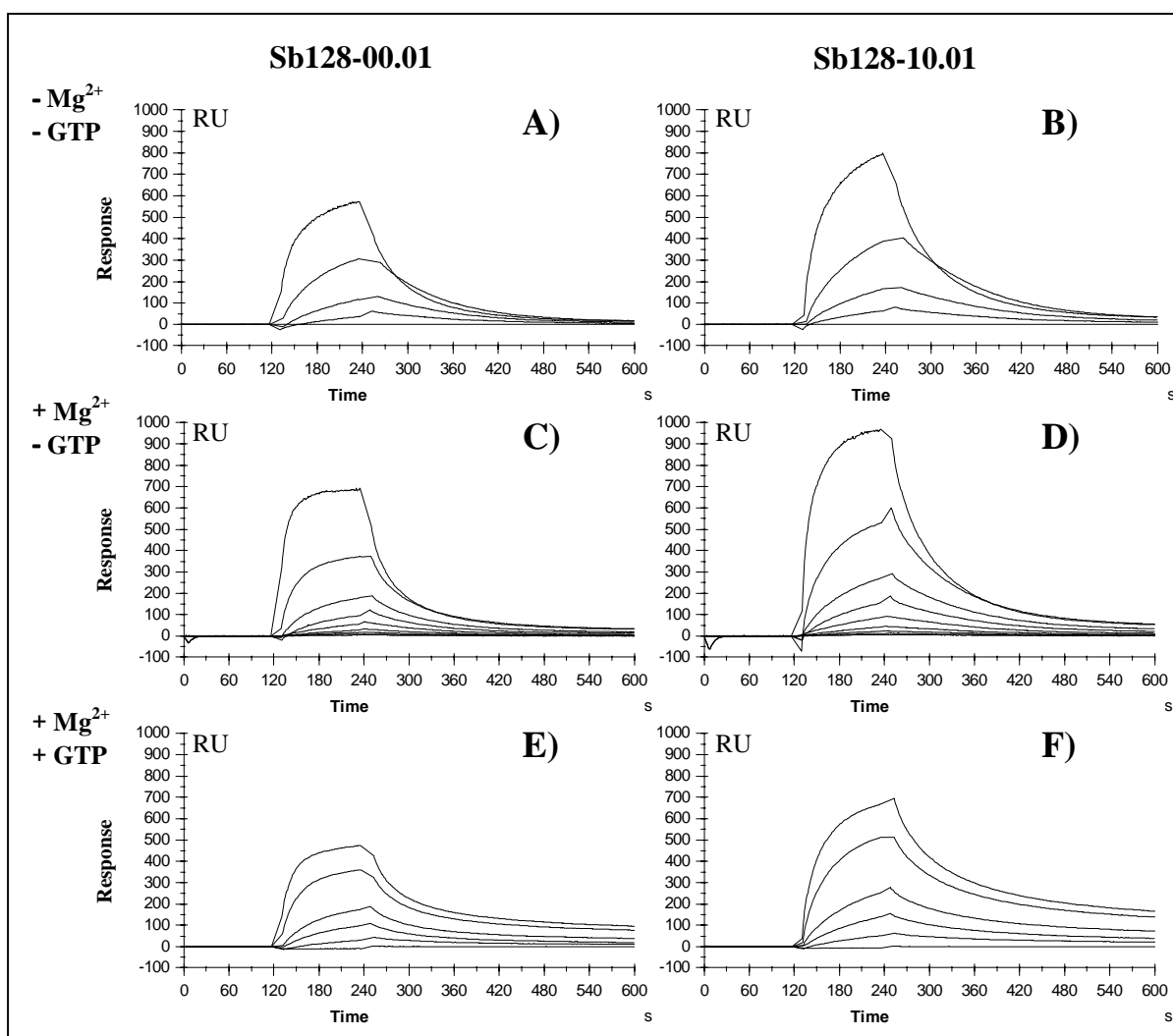


Abbildung 13: Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen DNA-Bindung durch McrB.

Die gezeigten Sensorgramme entstanden analog zu den in Abbildung 12 gezeigten, mit McrB₁₋₁₆₂ gewonnenen Daten mit den 128 bp langen Substratmolekülen Sb128-00.01 (linke Spalte, Sensorgramme A, C und E) bzw. Sb128-10.01 (rechte Spalte, Sensorgramme B, D und F). Die Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ im Bindungspuffer während der Aufnahme der Messkurven nebeneinander stehender Sensorgramme ist jeweils am linken Bildrand durch +Mg²⁺ (Sensorgramme C bis F), die Abwesenheit von Magnesiumionen durch -Mg²⁺ (Sensorgramme A und B) angegeben. Entsprechende Symbolik gilt für die Anwesenheit von 1 mM GTP im Bindungspuffer (+GTP, Sensorgramme E und F) bzw. für das Fehlen von GTP während der Messung (-GTP, Sensorgramme A bis D). Die gezeigten Messkurven resultierten mit zunehmenden maximalen *Response*-Werten während der 120 s andauernden Bindungsmessung aus GST-McrB-Konzentrationen folgender Reihenfolge: Sensorgramme A und B: 0 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M bzw. 4 μ M; Sensorgramme C und D: 0 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M bzw. 4 μ M; Sensorgramme E und F: 0 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M bzw. 2 μ M.

4.3.2. McrB

Im Unterschied zu der oben beschriebenen, für die Bindungsstudien verwendeten N-terminalen Domäne von McrB, McrB₁₋₁₆₂, vermag das vollständige McrB-Protein neben der

DNA-Bindung auch die Bindung und Hydrolyse von GTP durchzuführen. Dies wurde bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten, die auf der Verwendung des zuvor beschriebenen Systems beruhen (vgl. S. 156), berücksichtigt, indem die Bindungsexperimente sowohl in Anwesenheit von GTP, als auch in Abwesenheit des Kofaktors durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss von Magnesiumionen auf das Bindungsverhalten von McrB an spezifische DNA-Substrate untersucht. Wichtige, im Rahmen dieser Untersuchung mit Hilfe von BIAcore-Instrumenten erhaltene Daten sind in Abbildung 13 gezeigt (bei einem direkten Vergleich der in den Sensorgrammen gezeigten Messkurven sind die jeweils bei den Experimenten verwendeten, in der Legende der Abbildung vermerkten Konzentrationen an McrB zu berücksichtigen). Die mitunter durch McrB, insbesondere bei höheren Konzentrationen des Proteins, verursachten Massenänderungen an der Messoberfläche jener Flusszelle, die die nichtmethylierte DNA (Sb128-00.00) enthält, werden durch unspezifische Bindungsereignisse von McrB an DNA ausgelöst. Wie zuvor bei der Auswertung der für McrB₁₋₁₆₂ gewonnenen Daten wurden daher auch hier die durch die unspezifische Bindung erhaltenen Messwerte von den Bruttomesswerten der spezifischen Substrate abgezogen. Wie zuvor in Abbildung 12 zeigen somit die in den Sensorgrammen der Abbildung 13 dargestellten Kurven Netto-Massenänderungen an der Messoberfläche der Flusszellen im Sensorchip des BIAcore-Instruments, die durch die in den verwendeten DNA-Substraten Sb128-00.01 bzw. Sb128-10.01 vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen verursacht wurden.

Die McrB-Untereinheit vermag sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der Kofaktoren des McrBC-Restriktionssystems (Magnesium-Ionen bzw. GTP) spezifische DNA-Bindungsreaktionen einzugehen. Wie Abbildung 13 zeigt, beeinflussen diese Faktoren jedoch das DNA-Bindungsverhalten des Proteins. Zusätzlich spielt auch bei McrB, wie bei McrB₁₋₁₆₂, die Anzahl der im DNA-Molekül vorhandenen spezifischen Bindungsstellen bei der mit dem BIAcore-Instrument gemessenen Änderung der Massenkonzentration an der Messoberfläche eine Rolle. Während jedoch im Falle der N-terminalen Domäne der Massenzuwachs bei der Bindungsmessung gleicher Konzentrationen von McrB₁₋₁₆₂ am Substrat mit zwei McrBC-Erkennungssequenzen (Sb128-10.01) doppelt so groß war wie am Substrat, das nur eine McrBC-Erkennungssequenz enthält (Sb128-00.01), ist die Abhängigkeit des gemessenen Massenzuwachses im Falle von McrB nicht direkt proportional zu der vorhandenen Anzahl an spezifischen Bindungsstellen im Substrat. Dies zeigt der Vergleich der Sensorgramme A und B, C und D bzw. E und F in Abbildung 13, deren Messkurven jeweils durch Verwendung gleicher McrB-Konzentrationen (s. Legende der

Abbildung) und unter gleichen Milieubedingungen aufgenommen wurden. Zwar bilden sich am Substrat Sb128-10.01 Komplexe, die bei jeweils gleichen McrB-Konzentrationen insgesamt stets größer sind als die an Sb128-00.01 entstehenden, aber der sie in der Größe unterscheidende Faktor ist kleiner als 2. Dies zeigt, dass die Bindung von McrB an die beiden McrBC-Erkennungssequenzen von Sb128-10.01 nicht unabhängig voneinander erfolgt. Im Unterschied hierzu zeigten die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen der DNA-Bindung von McrB an das Substrat Pf1793-11.10 eine unabhängige Bindung der Proteine an beide im Substrat vorhandenen McrBC-Erkennungselemente (vgl. S. 152). Zwischen beiden Substraten bestehen jedoch deutliche Unterschiede, zum Einen ist die DNA Pf1793-11.10 um den Faktor 14 länger als das Sb128-Substrat, zum Anderen sind beide in Pf1793-11.10 vorhandenen McrBC-Erkennungselemente durch 269 bp voneinander separiert, in Sb128-10.01 jedoch lediglich durch 66 bp. Demnach führt die vierfach längere Distanz der spezifischen Bindungsstellen in Pf1793-11.10 nicht zu einer direkten Interaktion der an beide McrBC-Erkennungselemente bindenden McrB-Proteine, während dies bei einer Separation der beiden Bindungsstellen durch die kürzere Distanz von 66 bp jedoch der Fall ist.

Weiterhin auffällig ist die kooperative Bindung von McrB an die im DNA-Substrat vorhandenen spezifischen Bindungsstellen, wie aus den erhaltenen *Response*-Werten der Sensorgramme in Abbildung 13 ersichtlich wird. Eine Interaktion von McrB mit einer spezifischen Bindungsstelle im Verhältnis von 1 : 1 würde eine Sättigung der DNA-Bindung durch McrB an dem Substrat Sb128-00.01 hervorrufen, die einem maximalen *Response*-Wert von 140 RU entspricht. Dieser Wert berechnet sich auf gleichem Wege, wie er auf Seite 158 für McrB₁₋₁₆₂ beschrieben wurde. Dabei wird in der hier durchgeführten Berechnung der für McrB zu erwartenden Werte das Molekulargewicht des für diese Messungen verwendeten GST-Fusionsproteins verwendet (ca. 80.66 kDa). Der Maximalwert von ca. 140 RU, der eine 1 : 1 Interaktion von McrB mit Sb128-00.01 bedeuten würde, wird in allen gezeigten Sensorgrammen, die sich auf dieses nur eine McrBC-Erkennungssequenz enthaltende Substrat beziehen (Abbildung 13 A, C und E), jedoch deutlich überschritten. Auch eine Interaktion von McrB pro spezifischer Bindungsstelle in einem Verhältnis von nur 2 : 1 kann ausgeschlossen werden (Erwartungswert: max. ca. 280 RU). Hierbei ist zu beachten, dass bei allen Messungen keine Sättigung der spezifischen DNA-Bindung durch McrB erreicht werden konnte und die maximal erreichbaren *Response*-Werte mit größeren McrB-Konzentrationen noch höher liegen als die in den Sensorgrammen gezeigten Werte. Für die Sensorgramme A bis D der Abbildung 13, die aus Bindungsmessungen ohne Anwesenheit von GTP im verwendeten Puffer resultieren, ist eine Bestimmung des maximalen *Response*-Werts durch

Extrapolation der vorhandenen Daten nicht möglich, da innerhalb einer Messreihe eine Verdoppelung der verwendeten McrB-Konzentration stets zu verdoppelten *Response*-Werten während der Bindungsmessung führt. Somit wurde der Konzentrationsbereich von McrB nicht erlangt, der den Beginn einer Sättigung anzeigt (eine weitere Erhöhung der McrB-Konzentration war aus technischen Gründen in den jeweiligen Experimenten nicht möglich). Anders verhält es sich mit den in den Sensorgrammen E und F gezeigten Daten, die aus Bindungsmessungen unter Anwesenheit von 1 mM GTP im verwendeten Puffer resultieren. Die bei den Bindungsmessungen erhaltenen Werte der Massenänderung für den höchsten verwendeten Konzentrationswert von McrB (2 μ M) sind nicht mehr um den Faktor 2 größer als die der nächst niedrigeren McrB-Konzentration (1 μ M), was eine Annäherung an den Sättigungsbereich der McrB-Bindung anzeigt. Eine Extrapolation der Daten läßt für diese Bedingungen maximale *Response*-Werte von ca. 0.6 kRU (Substrat Sb128-00.01, Sensorgramm E) bzw. 0.9 kRU (Substrat Sb128-10.01, Sensorgramm F) erwarten. Diese Werte entstehen, wenn vier (0.6 kRU) bzw. sechs (0.9 kRU) Proteine GST-McrB pro DNA-Molekül mit einer Länge von 128 bp binden. Bezogen auf die Anzahl der in den Substratmolekülen vorhandenen Erkennungssequenzen des McrBC-Systems bedeutet dies eine Interaktion im Verhältnis 4 : 1 (Sb128-00.01; Erwartungswert für eine 4 : 1 Interaktion max. ca. 560 RU) bzw. von 6 : 2 (Sb128-10.01; Erwartungswert für eine 6 : 2 Interaktion max. ca. 840 RU).

Die genannten Sättigungswerte in Anwesenheit von GTP werden durch die extrapolierten maximalen *Response*-Werte bei Bindungssättigung in Abwesenheit von GTP in den in Abbildung 13 gezeigten Sensorgrammen A und C bzw. B und D noch deutlich überschritten. Dies bedeutet, dass die sich in Anwesenheit von GTP (und Mg^{2+}) bildenden McrB-Komplexe an spezifischen Erkennungselementen (bestehend aus vier McrB-Monomeren pro singulärer McrBC-Erkennungssequenz bzw. aus sechs McrB-Monomeren pro zwei durch 66 bp distanzierten Erkennungssequenzen) kleiner sind als die in Abwesenheit von GTP entstehenden McrB-Komplexe. Demnach moduliert der Kofaktor GTP deutlich die Ausbildung von McrB-Komplexen an der für das McrBC-System spezifischen DNA-Sequenzen. Der direkte Vergleich der für jeweils identische Konzentrationen an McrB erhaltenen Änderungen der *Response*-Werte während der Bindungsmessung in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit des Kofaktors GTP zeigt, dass in Anwesenheit von GTP gebildete Proteinkomplexe an der DNA durchschnittlich um den Faktor ca. 1.5 größer sind als diejenigen, die in Abwesenheit des Kofaktors gebildet werden. Der Effekt, dass unter ansonsten identischen Bedingungen aus gleichen Proteinkonzentrationen an McrB an

identischen Substraten bei Abwesenheit von GTP größere Komplexe gebildet werden als bei Anwesenheit von GTP, kann nur dadurch erklärt werden, dass die spezifische DNA-Bindung von McrB durch den Kofaktor GTP verstärkt wird.

Auch die Anwesenheit von Magnesiumionen während der spezifischen DNA-Bindung durch die McrB-Untereinheit besitzt einen Einfluss auf die Größe der an den spezifischen DNA-Sequenzen gebildeten Komplexe. Die bei jeweils gleicher McrB-Proteinkonzentration gebildeten Komplexe sind an Sb128-00.01 durchschnittlich um den Faktor 1.3 größer, wenn der während der Bindungsreaktion verwendete Puffer 10 mM MgCl₂ enthält (Abbildung 13 C), als diejenigen Komplexe, die an diesem Substrat bei Abwesenheit von MgCl₂ entstehen (Abbildung 13 A). Ähnlich verhält es sich mit den an dem zwei McrBC-Erkennungssequenzen enthaltenden Substrat Sb128-10.01 gebildeten McrB-Komplexen, die bei jeweils gleichen McrB-Konzentrationen unter Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ (Abbildung 13 D) durchschnittlich um den Faktor 1.7 größer sind als unter Abwesenheit der Magnesiumionen (Abbildung 13 B). Das bedeutet, dass der Kofaktor Mg²⁺ die spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von McrB zu modulieren vermag, wobei bei Anwesenheit des Kofaktors eine verstärkte Bindung von McrB-Komplexen an McrBC-Erkennungssequenzen erfolgt. Durch die zusätzliche Anwesenheit des zweiten Kofaktors des McrBC-Restriktionssystems, GTP, wird, wie oben gezeigt, die spezifische DNA-Bindung durch die McrB-Untereinheit noch weiter verstärkt. Diese zusätzliche Verstärkung der spezifischen DNA-Bindung der McrB-Komplexe scheint mit einer anderen Organisation der McrB-Untereinheiten innerhalb der Komplexe einherzugehen. Während bei Anwesenheit beider Kofaktoren (Mg²⁺, GTP) maximal vier McrB-Untereinheiten pro singulärer McrBC-Erkennungssequenz an der Komplexbildung beteiligt sind (oben gezeigt für das DNA-Substrat Sb128-00.01), enthalten in Abwesenheit von GTP gebildete McrB-Komplexe am gleichen DNA-Substrat deutlich mehr McrB-Untereinheiten, wie oben gezeigt wurde.

4.3.3. McrC

Für die im Rahmen dieser Untersuchungen verwendeten Präparationen von GST-McrC bzw. His₆-McrC konnte durch Verwendung der BIAcore-Instrumente keine methylierungsspezifische Bindung der McrC-Untereinheit an die verwendete DNA (Sb128-00.01 bzw. Sb128-10.01) nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Erwartungswert für McrC, da für diese Untereinheit bisher keine spezifische DNA-Bindung gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel *McrC*, S. 25).

4.3.4. McrBC

Die Bildung von McrBC-Komplexen an verschiedenen modifizierten DNA-Substraten wurde mit Hilfe von Messungen der Oberflächen-Plasmonresonanz in einem BIAcore-Instrument beobachtet, die entsprechend den zuvor beschriebenen Messungen durchgeführt wurden. Davon abweichend wurde jedoch bei diesen Experimenten aus Gründen der Verfügbarkeit das Substrat Sb128-10.00 anstelle von Sb128-00.01 verwendet. Beide DNA-Moleküle enthalten in der identischen Basensequenz jeweils nur eine einzige McrBC-Erkennungssequenz, die sich jedoch in beiden Substraten an unterschiedlicher Position befindet (vgl. S. 141). Abbildung 14 zeigt die Änderungen der *Response*-Werte nach Zugabe von 100 nM McrB bzw. nach Zugabe von 100 nM McrB und 200 nM McrC. In diesem Sensorgramm wurden die für die einzelnen DNA-Substrate erhaltenen Messwerte lediglich gegen die bei der Messzelle, die keine an die Oberfläche gekoppelte DNA enthält, auftretenden Effekte verrechnet, so dass auch unspezifische Bindungseffekte sichtbar werden.

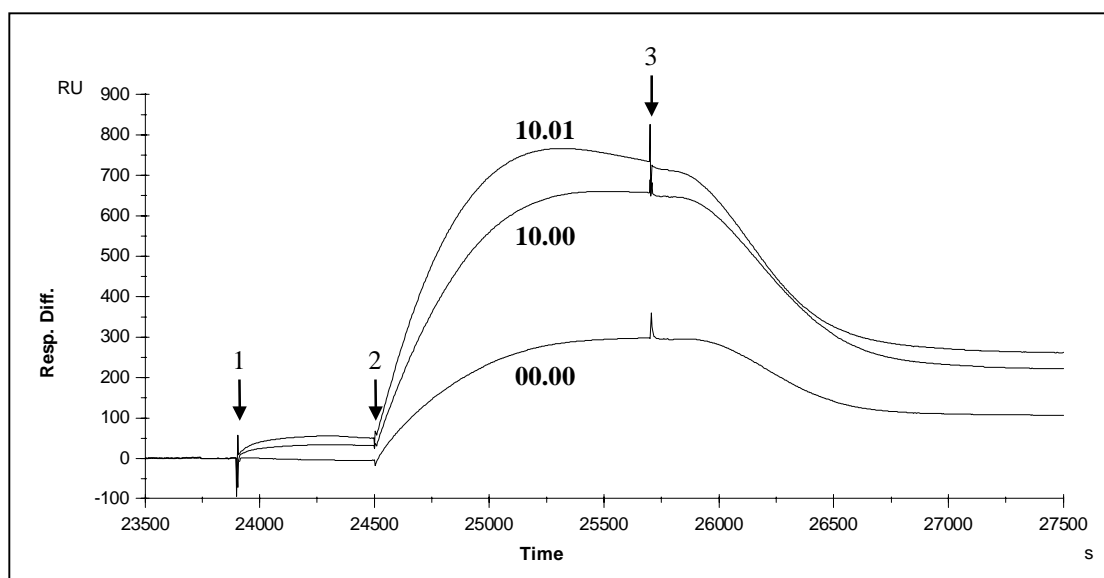


Abbildung 14: Bildung von McrBC-Komplexen an unterschiedlich methylierter DNA.

Das Sensorgramm zeigt die Bildung von McrB- und McrBC-Komplexen an 128 bp langen DNA-Substraten, die unmethyliert sind (Sb128-00.00) oder eine (Sb128-10.00) bzw. zwei durch 66 bp getrennte McrBC-Erkennungssequenzen enthalten (Sb128-10.01), bei Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ und 1 mM GTP. Die im Sensorgramm gezeigten Messkurven sind den entsprechenden DNA-Substraten durch Angabe ihres Methylierungsmusters zugeordnet. Zu dem mit 1 gekennzeichnetem Zeitpunkt beginnt die zehnminütige Aufnahme der Bindungskurve von 100 nM McrB an die DNA-Substrate. Zum dem mit 2 markierten Zeitpunkt beginnt die sich direkt daran anschließende 20minütige Aufnahme der Bindungskurve von 100 nM McrB mit Zusatz von 200 nM McrC. Zu dem mit 3 gekennzeichneten Zeitpunkt beginnt die Messung der Dissoziation der Komplexe von der DNA. Näheres s. Text.

Die Zugabe von 100 nM GST-McrB (im Sensorgramm der Abbildung 14 gekennzeichnet durch den mit 1 beschrifteten Pfeil) bei Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ und 1 mM GTP führt zu Änderungen der *Response*-Werte, die auch schon zuvor für diesen Konzentrationsbereich beobachtet wurden. Während McrB bei dieser Konzentration keine unspezifische DNA-Bindung zeigt (der *Response*-Wert für Sb128-00.00 ändert sich nicht), bilden sich an den spezifisch methylierten DNA-Substraten McrB-Komplexe. Die durch 100 nM McrB an dem zwei getrennte McrBC-Erkennungssequenzen enthaltenden DNA-Substrat Sb128-10.01 auftretende Massenänderung während der Bindungsmessung ist um den Faktor 1.5 größer als an dem nur eine McrBC-Erkennungssequenz besitzenden Substrat Sb128-10.00. Dieser Unterschied wurde zuvor schon für die Substrate Sb128-00.01 und Sb128-10.01 festgestellt (vgl. S. 162). Die zusätzliche Injektion von 200 nM GST-McrC, gemeinsam mit 100 nM McrB (im Sensorgramm der Abbildung 14 gekennzeichnet durch den mit 2 beschrifteten Pfeil) bewirkt an allen drei Substraten, also auch an unspezifischer DNA, eine sehr deutliche Erhöhung des *Response*-Werts. Dieser Effekt ist weder mit den hier verwendeten Konzentrationen von McrB alleine (s. o., sowie Kapitel 4.3.2, S. 159) noch von McrC alleine (s. Kapitel 4.3.3, S. 163) zu beobachten. Die Protein-Protein-Interaktion zwischen den Untereinheiten McrB und McrC vermag also deren Affinität zu DNA (bei Anwesenheit der Kofaktoren Mg²⁺ und GTP) enorm zu steigern. Dies ist nicht nur für die spezifischen DNA-Substrate Sb128-10.00 und Sb128-10.01 der Fall, sondern gilt auch für die unspezifische DNA (Sb128-00.00). Nach Abzug der Werte, die durch unspezifische Bindung der McrBC-Komplexe an DNA erhalten wurden, zeigen sich sehr deutlich methylierungsspezifische Bindungseffekte, die für das zwei durch 66 bp separierte McrBC-Erkennungssequenzen besitzende Substrat Sb128-10.01 um den Faktor 1.3 bis 1.4 größer sind als für das Substrat mit singulärer McrBC-Erkennungssequenz (Sb128-10.00). In Anwesenheit der McrC-Untereinheit, die in der genannten Konzentration selbst keine DNA-Bindung zeigt, vergrößern sich die bei unveränderter Konzentration der McrB-Untereinheit gebildeten Proteinkomplexe um einen Faktor der Größenordnung 10, wobei die Stöchiometrie der beiden Untereinheiten in den gebildeten Komplexen unklar ist.

Wie die Messkurve 10.01 des Sensorgramms in Abbildung 14 zeigt, nimmt die Massenkonzentration der Messoberfläche bei Substrat Sb128-10.01 während der Anwesenheit von 100 nM McrB und 200 nM McrC zwar zunächst deutlich zu (beginnend ab dem mit 2 markierten Zeitpunkt), nimmt dann aber noch vor Erreichen des Beginns der Dissoziationszeit (beginnend ab dem mit 3 markierten Zeitpunkt) wieder ab. Dieses Phänomen kann als eine DNA-Spaltung der an die Sensoroberfläche immobilisierten DNA-Moleküle (Sb128-10.01)

durch das McrBC-Restriktionssystem gedeutet werden. Zum Einen ist die DNA Sb128-10.01 im Gegensatz zu Sb128-10.00, bei dem dieser Effekt nicht auftritt, ein durch das McrBC-System spaltbares Substrat, zum Anderen fanden die Messungen unter Milieubedingungen statt, bei denen das McrBC-Restriktionssystem mit geeigneten DNA-Substraten eine DNA-Spaltung durchführen kann. Der Rückgang des für Sb128-10.01 erhaltenen *Response*-Werts während der Anwesenheit von McrB, McrC sowie der McrBC-Kofaktoren Mg^{2+} und GTP könnte somit durch die Dissoziation von zuvor gebildeten, DNA-spaltaktiven McrBC-Komplexen nach erfolgter DNA-Spaltung entstehen. Von einem Nachweis von Spaltprodukten während der Messungen mit dem BIAcore-Instrument wurde jedoch abgesehen.

5. Untersuchungen zur DNA-Spaltung

Das GTP-abhängige System McrBC wurde durch seine Fähigkeit entdeckt, bestimmte Modifikationen enthaltende Phagen-DNA spalten zu können. Obwohl historisch der entscheidende Auslöser für diese Restriktionsaktivität zunächst in einer fehlenden Glukosylierung der Phagen-DNA vermutet und das Restriktionssystem daher zunächst als Rgl-System (*rgl* für *restriction of glucoseless phages*) bezeichnet wurde, erkennt das System diverse Modifikationen an Cytosinresten in einem bestimmten Sequenzkontext. Zu diesen Modifikationen gehören bekanntermaßen sowohl unpolare Methylgruppen, die sich an der C5- sowie an der exozyklischen N⁴-Position befinden können, als auch polare Hydroxymethylgruppen (an der C5-Position), während größere Modifikationen, wie Glukosylierungen, von dem System nicht erkannt werden. Ein Charakteristikum des McrBC-Systems ist es, dass es zwar eine sehr kurze und einfach organisierte Erkennungssequenz besitzt (5'-R^mC-3'), aber für eine Restriktionsspaltung linearer DNA mindestens zwei solcher Sequenzen in dem zu spaltenden Molekül vorhanden sein müssen. Hierbei spielt es nach dem derzeitigen Wissensstand nur eine untergeordnete Rolle, in welcher Orientierung diese Sequenzen zueinander liegen, während hingegen ihr Abstand voneinander einen sehr großen Einfluss auf die Spaltaktivität des McrBC-Systems ausübt. Da zwei McrBC-Erkennungssequenzen, die 40 bis 80 bp voneinander entfernt liegen, ein Spaltereignis durch das Restriktionssystem auslösen können, wurde für das McrBC-System eine Erkennungssequenz in der Form 5'-R^mCN₄₀₋₈₀R^mC-3' beschrieben (Sutherland *et al.*, 1992). Weshalb das McrBC-

System für eine Spaltung linearer DNA mindestens zwei Erkennungssequenzen benötigt und in welcher Weise der Abstand dieser Sequenzen voneinander einen Einfluss auf die Spaltaktivität des Enzymkomplexes ausübt, ist jedoch nicht bekannt. Nachfolgend beschrieben sind in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse, die aus Untersuchungen zu dieser Thematik resultieren. Hierbei ist zu beachten, dass das McrBC-Restriktionssystem die Hydrolyse des Zuckerphosphatrückgrats der DNA nicht an klar definierten Positionen vollzieht, sondern innerhalb mehrerer Bereiche zwischen zwei Erkennungssequenzen an multiplen Positionen spalten kann. Die Spaltung eines definierten Substrates durch McrBC führt also immer zu einer ganzen Reihe verschieden großer Produkte, die bei einer gelanalytischen Auswertung der Fragmentierung entsprechend keine klar umgrenzte Produktbande ergeben, sondern eine die Auswertung wesentlich erschwerende Verteilung in der Gelbahn bilden.

Auch wenn nicht für jedes Experiment explizit angegeben, wurden sämtliche beschriebenen DNA-Spaltungen ausschließlich bei gemeinsamer Anwesenheit der McrB-Untereinheit und der McrC-Untereinheit des McrBC-Restriktionssystems, sowie Anwesenheit der Kofaktoren GTP und Mg^{2+} im Reaktionsansatz erhalten. Der Ersatz von GTP im Reaktionsansatz durch 5 mM ATP, welches ebenfalls ein Purinnukleosidtriphosphat ist, führte für keines der verwendeten Plasmid-Substrate (s. u.) zu DNA-Spaltungen durch das McrBC-System.

5.1.1. Sb73-DNA

Die Untersuchung der DNA-Spaltaktivität sollte mit einem DNA-Substrat erfolgen, das so einfach wie möglich organisiert sein sollte, um erhaltene Ergebnisse so eindeutig wie möglich interpretieren zu können. Dies bedeutet zum Einen, dass das verwendete DNA-Substrat so kurz wie möglich sein soll, zum Anderen eine minimale Anzahl an McrBC-Erkennungssequenzen besitzt. Nach den in der Literatur beschriebenen Anforderungen von McrBC an das zu spaltende DNA-Substrat sind zwei Erkennungssequenzen in einem Abstand von mindestens 40 bp für die Erzielung einer DNA-Spaltung notwendig. Dabei können beide Erkennungssequenzen jeweils in hemimethylierten DNA-Abschnitten liegen, d. h. auch in palindromen Sequenzabschnitten müssen nicht beide Stränge entsprechende Modifikationen tragen. Diese Gründe führten zu der Auswahl der DNA Sb73-10.01.00 als erstes Substrat für die Untersuchung der DNA-Spaltungseigenschaften von McrBC. Dieses 73 bp große PCR-Produkt enthält zwei Erkennungssequenzen des McrBC-Systems in Form von 5'-GM-3' (mit M = 5-Methylcytosin), die, bedingt durch ihre Entstehung unter Verwendung methylierter

PCR-primer, auf beide DNA-Stränge verteilt, gegenläufig orientiert und durch 51 bp separiert sind (vgl. S. 137). Versuche zur Spaltung dieses Substrates durch das McrBC-System ergaben McrBC-spezifische Spaltprodukte der Größenordnung 40 bis 50 bp nach Inkubation der DNA mit 2 μ M McrB und 1.6 μ M McrC in einem Puffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ und 1 mM GTP. Zwar waren die Spaltprodukte schon nach 15minütiger Inkubation des Spaltansatzes bei 37 °C nachweisbar, aber selbst nach einstündiger Inkubation wurden maximal 1 bis 2 % des Substrates spezifisch umgesetzt. Eine Erhöhung der Konzentration an McrB und/oder McrC erbrachte keine gesteigerte Ausbeute an Spaltprodukten. Die vollständige Methylierung von Sb73-10.01.00 mit *M.MspI* zu Sb73-11.11.10 erhöhte die erhaltene Ausbeute an Produkten aus Spaltungsreaktionen mit dem McrBC-System um den Faktor 3 bis 5. Hierbei ist zu beachten, dass durch die vollständige Methylierung der DNA nicht nur die Anzahl der vorhandenen Methylgruppen verdreifacht wird, sondern die Anzahl an vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen von zwei auf fünf steigt. Dadurch liegen die beiden vor der Methylierung vorhandenen, hemimethylierten McrBC-Erkennungselemente vollmethyliert vor, und ein drittes McrBC-Erkennungselement ist entstanden. Somit erzielte das Mehr an Methylierungen in der ansonsten unveränderten DNA zwar einen leicht gesteigerten Umsatz durch die McrBC-Restriktionsendonuklease (ein Effekt, der später diskutiert werden soll), aber zu Ungunsten der für eine Auswertung gewünschten Übersicht der Methylierungszahl. Bemerkenswert ist, dass trotz guter Rahmenbedingungen, wie z. B. dem 51-bp-Abstand zweier vollständig methylierter McrBC-Erkennungselemente, kein auch nur annähernd vollständiger Umsatz des Oligodesoxynukleotid-Substrates erreicht werden konnte.

Da der erreichte spezifische Umsatz dieses Substrates durch McrBC für detaillierte Untersuchungen der DNA-Spaltungseigenschaften trotz der durch das Einführen mehrerer Methylierungen erzielten relativen Erhöhung als zu gering bewertet wurde, sollten die Arbeiten mit dem Substrat Sb73 zunächst zurückgestellt werden und der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf Verwendung von Plasmid-Substraten liegen. Hinter dieser Entscheidung steckt die Annahme, dass nicht nur die Organisation der McrBC-Erkennungssequenzen im DNA-Substrat einen Einfluss auf die Spaltung von DNA durch das McrBC-System hat, sondern auch deren unmittelbare Sequenzumgebung. Auf diesen Punkt wird später noch genauer eingegangen. Von dem Plasmid pBW201 war innerhalb des hiesigen Institutes bereits bekannt, dass die vorlinearisierte Form des Plasmids durch das McrBC-System vollständig gespalten, d. h. mindestens eine Spaltung pro linearem Plasmidmolekül durch McrBC erzielt werden kann. Die Analyse der Spaltung des Plasmids

pBW201 sollte daher eine Identifizierung solcher Sequenzen ermöglichen, die besonders gut durch das McrBC-Restriktionssystem gespalten werden.

5.2. Plasmide

Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse resultieren aus Experimenten, die die Spaltung von Plasmid-DNA durch das McrBC-Restriktionssystem analysieren. Die Untersuchungen sollten dabei Bereiche des Plasmids pBW201 identifizieren, die besonders gut durch die Restriktionsendonuklease McrBC gespalten werden. Hierzu wurden einerseits auf verschiedene Art vorlinearisierte pBW201-Substrate in die Spaltungsuntersuchungen eingesetzt, und andererseits Derivate von pBW201 hergestellt, die in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. Die detaillierte Analyse der in der McrBC-Spaltreaktion entstehenden Fragmente ist jedoch problematisch, da das Enzymsystem eine unübersichtliche Vielzahl von Spaltfragmenten, jedoch keine homogenen, in ihrer Größe wohldefinierten Spaltprodukte liefert, was eine Größenbestimmung der entstehenden Fragmente und damit die Bestimmung von bevorzugten Spaltpositionen sehr erschwert. Die erhaltenen Ergebnisse werden nachstehend in thematischen Zusammenhängen erläutert, teilweise unabhängig von der chronologischen Reihenfolge ihrer Entstehung. Dies ist für ein erleichtertes Verständnis der zum Teil sehr komplexen Thematik sinnvoll.

5.2.1. pBW201

Das 4853 bp umfassende Plasmid pBW201 codiert für die *M.BsuFI*-Methyltransferase, die durch diesen Vektor *in vivo* in geeigneten Bakterien (*E. coli* TC410) konstitutiv exprimiert wird und Sequenzen des Typs 5'-CCGG-3' zu 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin) modifiziert (vgl. S. 45). Von den 19 in pBW201 vorhandenen Erkennungssequenzen der Methyltransferase werden 18 nach Methylierung durch *M.BsuFI* durch den jeweiligen Sequenzkontext zu Erkennungselementen des McrBC-Systems (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 46). In vier dieser Elemente ergibt die vollständige Methylierung der *M.BsuFI*-Erkennungssequenz zwei McrBC-Erkennungssequenzen, die anderen enthalten neben der 5'-RM-3'-Sequenz eine Sequenz des Typs 5'-YM-3', die keine Erkennungssequenz von McrBC darstellt. Die 18 McrBC-Erkennungselemente sind unregelmäßig in der Plasmid-DNA verteilt. Der für die McrBC-Spaltung als notwendig beschriebene Abstand zweier Erkennungselemente von 40 bis 80 bp (Sutherland *et al.*, 1992: die Erkennungssequenz von McrBC sei $R^mCN_{40-80}R^mC$) kommt in dem Plasmid nur zweimal vor (65 bp zwischen den

Erkennungselementen Nr. 6 und 7; 70 bp zwischen dem vorletzten und letzten Element). In drei Fällen ist der Abstand geringer als 40 bp (28, 24 und 24 bp), einige Abstände der McrBC-Erkennungselemente sind etwas größer als 80 bp (88, 90, 112, 149 und 154 bp), andere deutlich größer (188, 221, 232, 240, 303, 398, und 515 bp). Im Bereich des für die Methyltransferase codierenden *hsmFI*-Gens sind über einen Abschnitt von 1900 bp keine Erkennungselemente vorhanden.

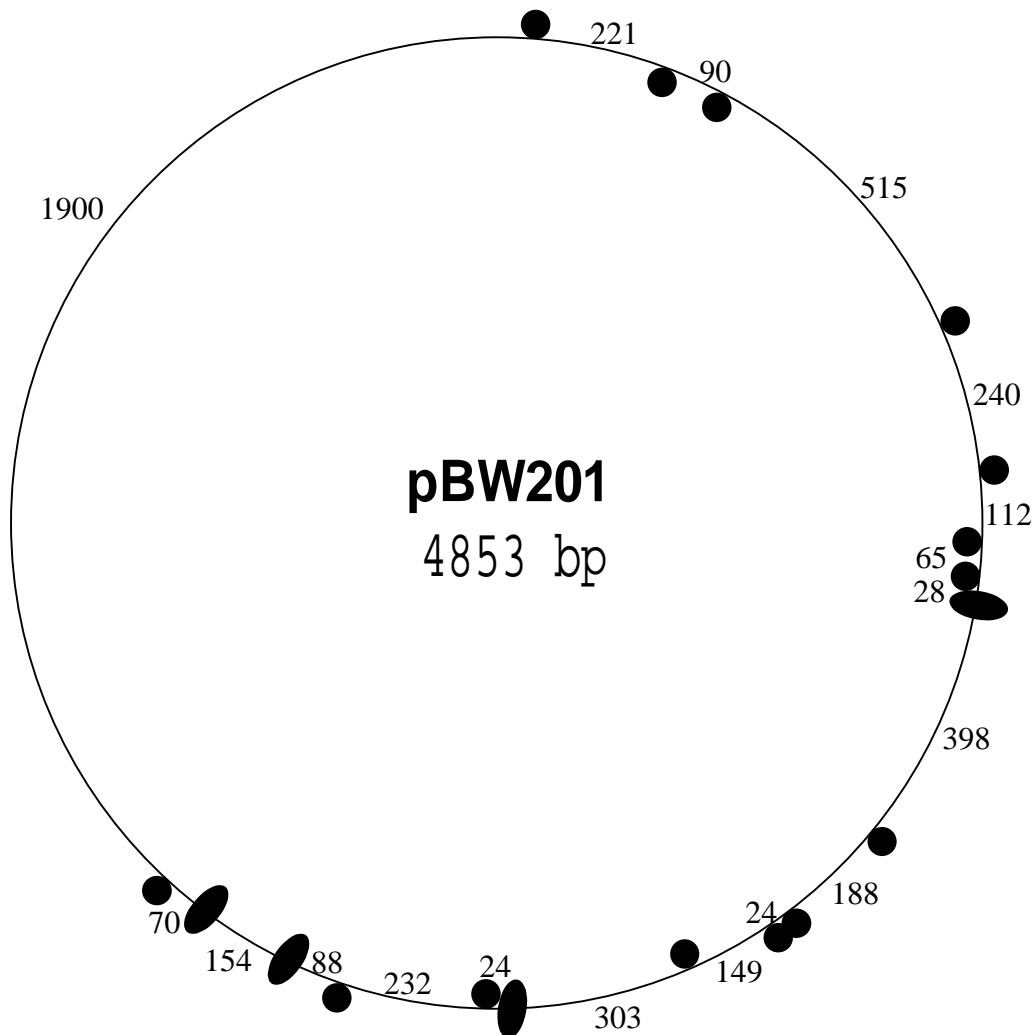


Abbildung 15: Abstand der McrBC-Erkennungselemente in dem Substratplasmid pBW201.

Das Plasmid pBW201 ist schematisch als Kreislinie dargestellt. Die aus *M.Bsu*FI-Methylierung resultierenden Erkennungssequenzen des Restriktionssystems McrBC sind als schwarze Symbole gekennzeichnet und entsprechen in ihrer relativen Lage den in der Plasmidkarte von pBW201 auf S. 46 gezeigten 5'-RM-3' Sequenzen. McrBC-Erkennungselemente mit einer im oberen DNA-Strang liegenden 5'-RM-3' Sequenz (M = 5-Methylcytosin) sind dabei als außerhalb der Kreislinie liegende, solche mit einer im unteren Strang liegenden als innerhalb der Kreislinie liegende schwarz ausgefüllte Kreise symbolisiert. Elemente, die infolge der Methylierung der *M.Bsu*FI-Erkennungssequenz in beiden Strängen eine McrBC-Erkennungssequenz besitzen, sind als schwarz ausgefüllte Ellipsen gezeigt. Die Zahlen zwischen den symbolisierten McrBC-Erkennungselementen geben die Anzahl der zwischen den beiden McrBC-Erkennungselementen stehenden Basenpaare an.

Die DNA-Bindung des Substratplasmids pBW201 durch die Proteinkomplexe des McrBC-Restriktionssystems ist recht stark. Dies gilt auch für die aus der Spaltung hervorgehenden Plasmidfragmente, was zu erheblichen Problemen bei der Auswertung der Spaltreaktionen mit Hilfe von gelelektrophoretischen Methoden führen kann. Sowohl bei der Elektrophorese mit nativen Polyacrylamid-Gelen als auch bei Verwendung von Agarose-Gelen wurde sehr häufig beobachtet, dass die an Proteinkomplexe gebundene DNA nicht in das Gelsystem einwandert. Die hohe Anzahl von Erkennungselementen kann jedoch nicht nur zu einer guten Bindung des McrBC-Restriktionssystems an diese DNA führen, sondern auch zu Spaltungsreaktionen. Dabei kann sowohl zirkulär geschlossene Plasmid-DNA als Substrat für Restriktionsspaltungen durch McrBC dienen, als auch durch andere Restriktionsenzyme vorlinearisierte Formen der Substrat-DNA.

5.2.1.a. Spaltung von zirkulärem pBW201

In einer Spaltungskinetik von McrBC mit zirkulärem Plasmidsubstrat pBW201, wie in Abbildung 16 gezeigt, beginnt der weitere Abbau der Plasmid-DNA noch vor der vollständigen Linearisierung des geschlossenen Plasmidringes durch die Restriktionsendonuklease McrBC. Während, wie im Falle der gezeigten Kinetik, nach 24minütiger Inkubation noch deutliche Reste von linearem, d. h. nur ein einziges Mal durch McrBC gespaltenem Plasmid zu erkennen sind, sind andere Plasmidmoleküle schon nach der Hälfte der Zeit deutlich fragmentiert worden. Die dabei entstandenen Plasmidfragmente besitzen keine einheitliche Größe und bilden daher im elektrophoretischen Gel keine einheitliche, definierte Bande. Dieses Phänomen wurde mit allen Substraten, die in dieser Arbeit durch das McrBC-System gespalten werden konnten, beobachtet und erschwert bei Plasmidsubstraten die Bestimmung der Schnittpositionen. Eine Bestimmung der Lage von Schnittstellen in einem Plasmid, wie sie für Typ II Restriktionsendonukleasen mit definierten Schnittpositionen möglich ist (Restriktionskartierung), kann im Falle des McrBC-Systems nicht ohne weiteres durchgeführt werden. Das breite Spektrum an erhaltenen Produktgrößen zeigt, dass die von Sutherland *et al.* (1992) veröffentlichte Erkennungssequenz von McrBC ($R^mCN_{40-80}R^mC$) insofern nur eingeschränkt gültig sein kann, dass das McrBC-System in pBW201 noch eine große Anzahl anderer Sequenzen für Spaltungsreaktionen nutzen kann. Die notwendigen Modifikationen dieser Erkennungssequenz nach Sutherland *et al.* (1992) betreffen, wie später gezeigt wird, neben der Orientierung der Erkennungssequenz 5'-RM-3' (M = 5-Methylcytosin) vor allem den genannten Abstandsbereich. Bei der Auswertung von Spaltungskinetiken mit dem McrBC-System an pBW201-Substraten, wie sie in Abbildung 16

gezeigt ist, fallen im Elektrophorese-Gel nur zwei Produktbanden auf, die aus DNA einer definierten Größe bzw. Molekülen annähernd definierter Größe bestehen. So führt die erste Durchspaltung zirkulärer Plasmid-DNA durch McrBC, wie durch andere Restriktionsenzyme auch, zu einer Linearisierung des Plasmides. Unabhängig von der Position dieser Durchspaltung ist das dadurch aus pBW201 entstehende Produkt immer 4853 bp lang (in Abbildung 16 mit *lin.* gekennzeichnet). Zur Überprüfung, ob die Linearisierung von zirkulärem pBW201 durch McrBC bevorzugt an einer bestimmten Position erfolgt, wurde das im Spaltansatz zunächst durch McrBC linearisierte Plasmid mit sog. *Einzelschneidern* nachgespalten. Unter diesem Begriff werden Restriktionsendonukleasen verstanden, die in einer bestimmten Plasmid-DNA (hier pBW201) nur eine einzige Kopie ihrer spezifischen Erkennungssequenz vorfinden. Nach Inaktivierung der McrBC-Restriktionsaktivität durch halbstündiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 72 °C (20 min bei 65 °C reichten hierzu nicht aus) wurde die durch McrBC linearisierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *AvaI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-C↓YCGRG-3') bzw. *BamHI* (5'-G↓GATCC-3') nachgeschnitten (die Lage dieser Schnittstellen in pBW201 ist in der Plasmidkarte von pBW201 auf S. 187 eingezeichnet). Bei dieser Nachspaltung der linearen DNA entstanden in keinem Falle zwei Spaltprodukte mit einer definierten Größe, wie es im Kontrollexperiment der Fall war (Linearisierung zirkulärer Plasmid-DNA durch einen Einzelschneider, z. B. *AvaI*, anschließendes Nachspalten mit einem zweiten Einzelschneider, z. B. *BamHI*), sondern stets ein breites Spektrum an Produkten unterschiedlicher Größe. Dies bedeutet, dass die erste Durchspaltung des zirkulären Plasmids pBW201 durch das McrBC-System nicht einheitlich in einer bestimmten Region erfolgt, sondern in gänzlich unterschiedlichen Bereichen des Plasmides. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass das McrBC-Restriktionssystem keine deutlich bevorzugte Schnittstelle in der zirkulären Plasmid-DNA besitzt.

Die zweite auffällige Produktbande der McrBC-Spaltungen entspricht DNA einer Größe von knapp unter 2 kbp (vgl. Abbildung 16, Gelbahn der Inkubationszeit von 192 min) und resultiert aus Fragmenten, die keine absolut, aber immerhin annähernd gleiche Größe besitzen. Nachspaltungen der McrBC-Spaltprodukte dieser Größe mit der Restriktionsendonuklease *BamHI*, deren einzige Schnittstelle in pBW201 zentral in dem dort vorhandenen *hsmFI*-Gen lokalisiert ist, zeigten, dass alle durch McrBC erzeugten Endprodukte dieser Größe durch *BamHI* spaltbar sind.

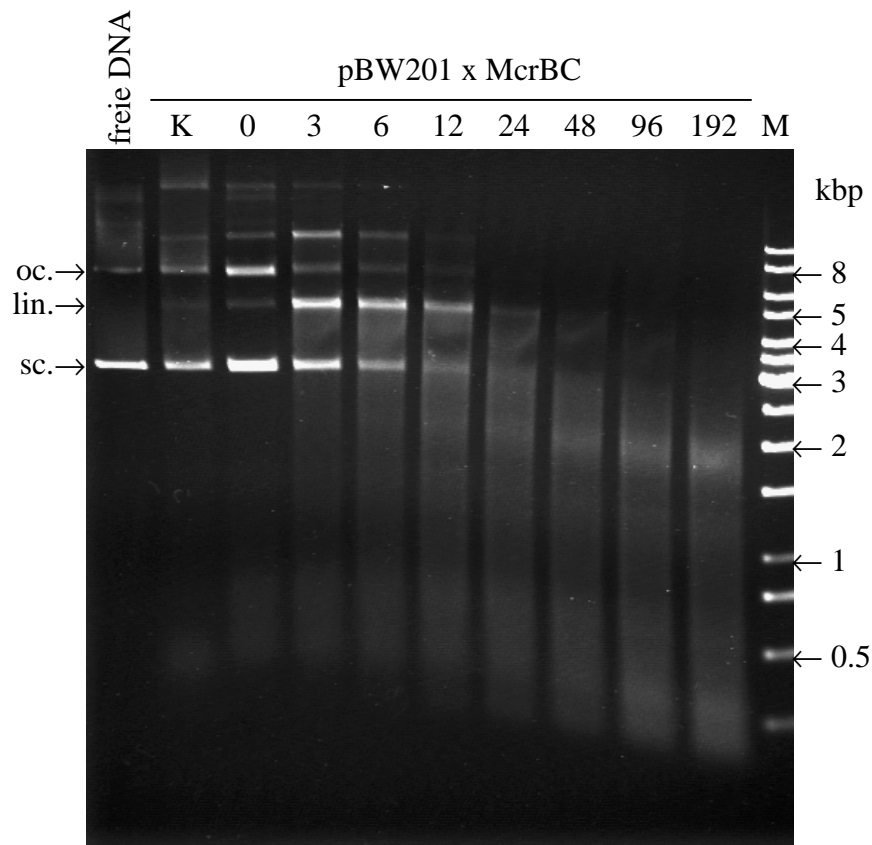


Abbildung 16: Spaltung von zirkulärem Plasmid pBW201 durch die Restriktionsendonuklease McrBC.

Gezeigt ist die gelanalytische Dokumentation der Kinetik einer Inkubation von 200 ng pBW201 aus *E. coli* TC410 mit 6 μM McrB, 2 μM McrC (beide Untereinheiten des McrBC-Systems als GST-Fusionsproteine) und 5 mM GTP in einem Puffersystem, bestehend aus 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 10 mM MgCl_2 ; 5 mM KCl; 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ BSA sowie 0.1 mM DTT (Gelsystem: 1 % Agarose; Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid). Ganz links sind 200 ng pBW201 aufgetragen, die Positionen der unterschiedlichen Zustandsformen des Plasmids im Gel sind am linken Bildrand vermerkt (*oc.*, offen zirkuläre Form; *lin.*, lineare Form; *sc.*, überspiralisierte zirkuläre Form). Mit *M* bezeichnet ist der verwendete Größenstandard (1 kbp DNA Leiter, Fa. MBI; vgl. S. 55), der die Lage von definierten, zum Teil am rechten Bildrand bezeichneten DNA-Längen im Gel anzeigt. Die Zahlen über den Gelbahnen der bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführten Kinetik (*pBW201 x McrBC*) bezeichnen die Inkubationszeit des Spaltansatzes in Minuten. Unter *K* ist ein identischer Ansatz ohne Zusatz von GTP aufgetragen, der für 192 min bei gleicher Temperatur inkubiert wurde.

Die dabei entstandenen Spaltfragmente wiesen eine uneinheitliche Länge mit Häufungen bei 0.9 kbp bzw. 1 kbp auf. Dies bedeutet, dass die durch McrBC erzeugten, ca. 1.9 kbp langen Endprodukte der pBW201-Spaltung der ca. 1.9 kbp langen methylierungsfreien Region von pBW201 entsprechen, die das Gen *hsmFI* beherbergt. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis von Experimenten zur Untersuchung der McrBC-Spaltung des Plasmids pBW201, das mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI vorlinearisiert wurde, interessant. Wie im

nachstehenden Kapitel im Zusammenhang mit Spaltungsexperimenten, die das Plasmid pBW201W als Substrat für das McrBC-Restriktionssystem verwenden, näher beschrieben wird (s. S. 181), entstehen aus McrBC-Spaltungen von *Bam*HI-vorlinearisiertem pBW201-Plasmid ebenfalls diese Fragmente mit einer Länge von etwa 0.9 kbp bzw. 1 kbp. Die Entstehung dieser Produkte ist also unabhängig davon, ob das zirkuläre Plasmid pBW201 erst mit der McrBC-Endonuklease und dann mit *Bam*HI geschnitten wird, oder umgekehrt, erst mit *Bam*HI und anschließend mit dem McrBC-Restriktionssystem. Das bedeutet, dass die Spaltung des pBW201-Substrates durch McrBC beidseitig der 1.9 kbp langen Region, die frei von McrBC-Erkennungssequenzen ist, weitestgehend unabhängig davon ist, ob die Plasmid-DNA inmitten dieser Region geschlossen ist oder nicht. Einschränkend muss gesagt werden, dass das hier verwendete Gelsystem keine Unterscheidung von Restriktionsfragmenten zulässt, deren Länge in einer Größenordnung von etwa 1 kbp liegen, sich in ihrer Länge aber tatsächlich um wenige Basenpaare unterscheiden. Somit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine möglicherweise vorhandene Wechselwirkung von McrBC-Untereinheiten über die methylierungsfreie *hsmFI*-Region von pBW201 hinweg zu einer DNA-Spaltung innerhalb der 1.9 kbp umfassenden Region innerhalb der Nähe der Erkennungselemente führt.

5.2.1.b. Spaltung von linearem pBW201

Die einzige Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Bam*HI liegt in der etwa 1.9 kbp langen Region von pBW201, die keine Erkennungssequenzen des McrBC-Systems enthält (vgl. Plasmidkarten S. 170 und S. 187). Die aus der *Bam*HI-Spaltung resultierende lineare Form von pBW201 enthält die 18 Erkennungselemente des McrBC-Systems also im zentralen Bereich des Moleküls, während die Endabschnitte der linearen DNA keine McrBC-Erkennungselemente besitzen. Die durchgeführten Untersuchungen zur Spaltung des linearen Plasmidsubstrats pBW201 · *Bam*HI mit der McrBC-Restriktionsendonuklease zeigen, dass als erstes, größtes Zwischenprodukt ein Fragment von etwa 4 kbp Länge entsteht, daneben etwas kleinere Zwischenprodukte (ca. 3.2 bzw. 3 kbp, zwei Fragmente \sim 2 kbp), die im Laufe der Kinetik weiter abgebaut werden. Der Einfluss einer Vorlinearisierung des Plasmids pBW201 mit *Bam*HI auf die Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem wurde schon erwähnt (vgl. S. 173) und wird später noch ausführlich besprochen (s. S. 181). Die Interpretation der durch McrBC erhaltenen Spaltungen erfolgt durch Vergleich der Resultate aus anderen Spaltungsexperimenten mit an anderer Stelle vorlinearisierter DNA des Plasmids pBW201. Ein anderes Restriktionsenzym mit singulärer Schnittstelle in pBW201 ist *Ava*I (s. o.), dessen

Schnittposition inmitten der Region von pBW201 liegt, die die McrBC-Erkennungssequenzen trägt (vgl. Restriktionskarte von pBW201, S. 187). Die Linearisierung von pBW201 mit *AvaI* teilt also den ca. 3 kbp langen Bereich von pBW201, der die 18 McrBC-Erkennungselemente enthält. Die daraus resultierende lineare Plasmid-DNA enthält endständig einen Abschnitt von ca. 0.7 kbp, der 6 McrBC-Erkennungselemente enthält und durch ca. 1.9 kbp von einem zweiten endständigen, etwa 2.3 kbp langen Abschnitt getrennt ist, der 12 Erkennungselemente des McrBC-Systems enthält. Das Ergebnis der Spaltung dieser Substrat-DNA durch das McrBC-Restriktionssystem zeigt Abbildung 17.

Als Endprodukt der McrBC-Spaltung dieses linearen Plasmidsubstrats entsteht, wie schon bei der McrBC-Spaltung des zirkulären Plasmids beschrieben, ein Spektrum an Fragmenten mit einer Größe von ~ 2 kbp. Diese Produkte sind, wie die aus der zirkulären Plasmidform entstehenden, gleichfalls durch das Restriktionsenzym *BamHI* spaltbar, was zeigt, dass sie das *hsmFI*-Gen tragen (die einzige *BamHI*-Schnittstelle von pBW201 liegt, wie oben erwähnt, in diesem Gen). Dies zeigt, dass die durch das McrBC erzeugten Durchspaltungen an den Enden dieses etwa 1.9 kbp langen, methylierungsfreien Abschnitts letztlich unabhängig davon entstehen, ob die Plasmid-DNA außerhalb dieses Abschnitts zirkulär geschlossen ist oder nicht. Allerdings tritt die aus diesen etwa 1.9 kbp langen Fragmenten bestehende Bande mit dem linearen Substrat schon nach einer Inkubationszeit von 3 min auf (s. Abbildung 17), während sie sich bei Spaltung des zirkulären Substrats mit McrBC unter identischen Bedingungen erst deutlich später zeigt (vgl. Abbildung 16).

Auch das in Abbildung 17 zu erkennende, ca. 2.6 kbp lange Zwischenprodukt, das während der Spaltung von *AvaI*-linearisiertem pBW201-Plasmid durch McrBC zu früher Zeit auftritt und über einen langen Zeitraum stabil ist (in der Abbildung von 3 min bis 192 min Inkubationszeit zu erkennen), ist durch das *BamHI*-Restriktionsenzym spaltbar. Die Nachspaltung dieses Fragments mit *BamHI* ergibt ein definiertes Fragment der Größe 1.65 kbp, das dem *AvaI/BamHI*-Restriktionsfragment entspricht, sowie Produkte mit einem Größenspektrum um 1 kbp. Dies zeigt eine bevorzugte Spaltung der Plasmid-DNA pBW201 durch das McrBC-System in der Nähe einer der ersten McrBC-Erkennungselemente nach dem 1.9 kbp langen, methylierungsfreien Abschnitt. Die Ortsangabe *nach* bezieht sich hierbei auf die Nummerierung der in dieser Arbeit gezeigten Plasmidkarten von pBW201, in denen die aufsteigende Nummerierung im Uhrzeigersinn orientiert ist. Die Bestimmung der Schnittposition der McrBC-Restriktionsendonuklease wird später erläutert (s. S. 180).

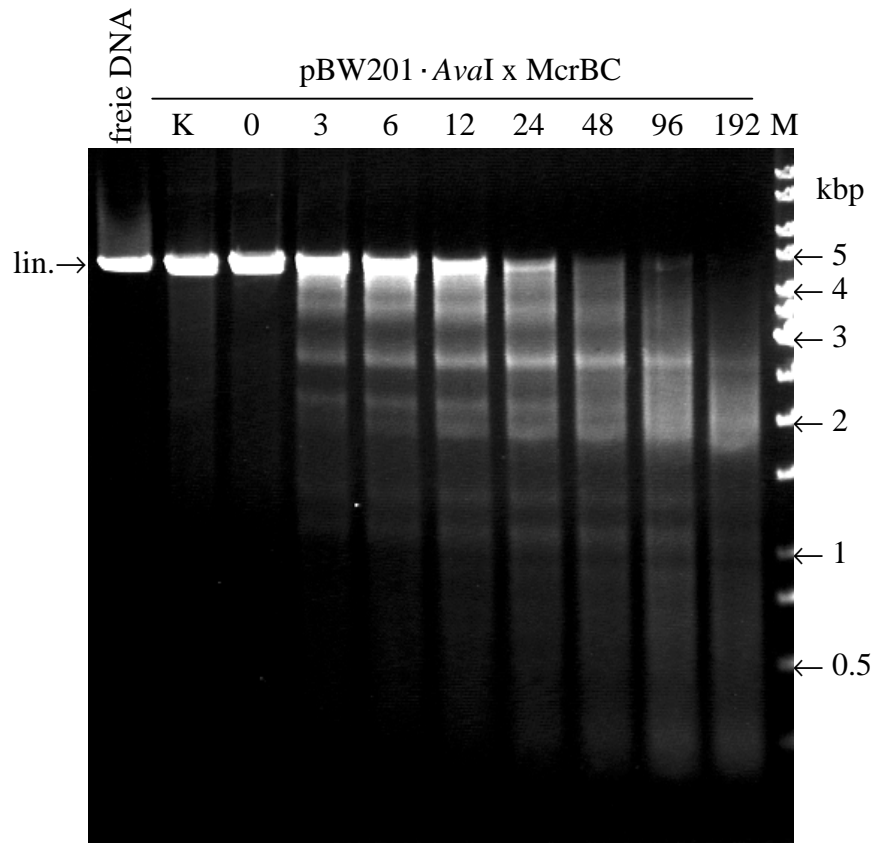


Abbildung 17: Spaltung von *AvaI*-linearisiertem Plasmid pBW201 durch die Restriktionsendonuklease McrBC.

Gezeigt ist die gelanalytische Dokumentation der Kinetik einer Inkubation von 200 ng pBW201 · *AvaI* unter identischen Bedingungen, wie sie bei Abbildung 16 angegeben sind (s. S. 173; Gelsystem: 1 % Agarose; Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid). Ganz links sind 200 ng durch *AvaI* linearisiertes pBW201 aufgetragen, die Positionen der linearen Zustandsform des Plasmids im Gel ist am linken Bildrand vermerkt (*lin.*). Mit *M* bezeichnet ist der verwendete Größenstandard (1 kbp DNA Leiter, Fa. MBI; vgl. S. 55), der die Lage von definierten, zum Teil am rechten Bildrand bezeichneten DNA-Längen im Gel anzeigt. Die Zahlen über den Gelbahnen der bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführten Kinetik (*pBW201* · *AvaI* x *McrBC*) bezeichnen die Inkubationszeit des Spaltansatzes in Minuten. Unter *K* ist ein identischer Ansatz ohne Zusatz von GTP aufgetragen, der für 192 min bei gleicher Temperatur inkubiert wurde.

Da die Restriktionsendonuklease McrBC keine klar definierten Schnittstellen im DNA-Substrat besitzt und die DNA zudem an multiplen Positionen zu schneiden vermag, wird ein Rückschluss auf die von McrBC verwendeten Schnittstellen im Plasmid-Substrat anhand des erhaltenen Spektrums unterschiedlich großer Spaltprodukte extrem erschwert. Um dennoch eine Vorstellung darüber zu erhalten, in welchen Bereichen des über 4.8 kbp umfassenden Plasmids pBW201 das McrBC-System bevorzugt spaltet, wurde zusätzlich eine Auswertung jener Fragmentierungsmuster durchgeführt, die aus McrBC-Spaltungskinetiken mit an verschiedenen Stellen vorlinearisierten pBW201-Substraten erhalten wurden. Dabei wurde

folgende Vereinfachung gemacht: Das McrBC-Restriktionssystem besitzt die Eigenschaft, ein Molekül DNA-Substrat *in der Nähe* einer der Erkennungssequenzen zwischen zwei Erkennungssequenzen einmalig durchzuspalten (vgl. Einleitung dieser Arbeit). Die statistische Verteilung der Positionen tatsächlich durch McrBC durchgeführter Schnitte in einer Region der DNA führt zu einem Spektrum ähnlich großer Produkte. Um mögliche Ursprünge während der McrBC-Spaltung von Plasmid-DNA auftretender Zwischen- und Endprodukte benennen zu können, wurde angenommen, dass das McrBC-Restriktionssystem die DNA *an* einer Erkennungssequenz spaltet. Für kleinere, aus der McrBC-Spaltung resultierende Produkte wurde dieses Verfahren nicht angewendet, da für geringere DNA-Längen der durch die Vereinfachung der Auswertung verursachte Fehler zu groß ist, um eine sinnvolle Aussage zu erhalten. Die zum Auftreten langer Spaltprodukte führenden Bereiche der DNA-Durchspaltungen lassen sich auf diese Weise jedoch gut kartieren. Hierzu wurden mit Hilfe eines Tabellen-Kalkulationsprogramms (Excel 97, Fa. Microsoft) alle theoretisch möglichen Produktgrößen berechnet. Eine solche Tabelle ist beispielhaft in Abbildung 18 gezeigt. Die Tabelle zeigt *alle* Fragmentgrößen an, die theoretisch bei Spaltungen von *AvaI*-vorlinearisiertem pBW201-Plasmid an McrBC-Erkennungssequenzen (5'-RM-3', mit M = 5-Methylcytosin) entstehen können. Alle durch die McrBC-Spaltung tatsächlich auftretenden Plasmidfragmente besitzen entweder ein durch McrBC erzeugtes und ein zuvor durch die *AvaI*-Linearisierung gebildetes Ende oder zwei im Rahmen der McrBC-Spaltung der DNA durch McrBC erzeugte Enden. Als Beispiel sei hier das im Falle der Spaltung des *AvaI*-vorlinearisierten Plasmids pBW201 mit McrBC entstandene, oben beschriebene ca. 1.9 kbp große Fragment angeführt (vgl. Abbildung 17). Diese Fragmentgröße tritt in der Tabelle, bei einem angenommenen Fehler von 60 bp, nur durch die Kombination von vier Schnittstellen auf (in Abbildung 18 grau unterlegt). Der hier berücksichtigte Fehler ist der doppelte Betrag der Anzahl von Basenpaaren, die das McrBC-System von einer Erkennungssequenz entfernt schneiden kann, um dennoch die angegebene Fragmentgröße zu erhalten. Der theoretischen Berechnung nach ergibt die Kombination folgender McrBC-Erkennungssequenzen ein Spaltfragment von ca. 1.9 kbp, wenn die McrBC-Restriktionsendonuklease pBW201 jeweils bis max. 30 bp von einer Erkennungssequenz entfernt schneidet (die nachfolgend angegebenen Positionsnummern beziehen sich auf die Position der 5-Methylcytosinreste in der auf S. 46 gezeigten Plasmidkarte von pBW201, die dabei berücksichtigte Orientierung entspricht einer Reihenfolge im Uhrzeigersinn; *RM* kennzeichnet eine McrBC-Erkennungssequenz): RM (Pos. 2999) → RM (Pos. 48); RM (Pos. 48) → RM (Pos. 1927); RM (Pos. 48) → RM (Pos. 1953); sowie RM (Pos. 362) → *AvaI*-Schnittstelle. Unter

Berücksichtigung des oben beschriebenen Nachweises, dass das bei der Spaltung von pBW201·*AvaI* mit *McrBC* entstandene 1.9 kbp lange Fragment durch die Restriktionsendonuklease *BamHI* spaltbar ist (*BamHI* spaltet bei der angegebenen Nummerierung nur an Pos. 3915), scheidet die letzten drei genannten Kombinationsmöglichkeiten aus, da die daraus entstehenden Fragmente die *BamHI*-Schnittstelle nicht enthalten. Nur die Kombination der *McrBC*-Erkennungssequenzen RM (Pos. 2999) → RM (Pos. 48) ergibt demnach das genannte *McrBC*-Spaltfragment. Erhöht man die zulässige Abweichung der tatsächlichen *McrBC*-Schnittstelle von 30 auf 40 bp und sucht mit Hilfe der Tabelle Kombinationen, die ein Fragment von 1.9 kbp ± 80 bp ergeben, so kommt, unter Berücksichtigung der *BamHI*-Spaltbarkeit des erhaltenen Fragmentes, noch eine Möglichkeit hinzu: RM(Pos. 2926) → RM(Pos. 48), in Verbindung mit RM(Pos. 2923) → RM(Pos. 48). Beide genannten Variationen beziehen sich auf das gleiche *McrBC*-Erkennungselement, das zwei 5'-RM-3'-Sequenzen (Pos. 2923/2926) enthält. Zusammenfassend spricht diese Auswertung für die Restriktion der pBW201-DNA durch *McrBC* in der Nähe der *McrBC*-Erkennungssequenz an Pos. 48, sowie für eine Restriktion in der Nähe der Erkennungssequenz an Pos. 2999. Letztere findet wahrscheinlich zwischen Pos. 2999 und dem nur durch 70 bp separierten Erkennungselement mit zwei *McrBC*-Erkennungssequenzen (Pos. 2923/2926) statt, wie unten gezeigt wird (vgl. Ergebnisse von Pf1193, S. 192).

Die durch die Tabellen ermittelten Spaltpositionen des *McrBC*-Systems im Substratplasmid pBW201 sind hypothetischer Natur, jedoch führt die Auswertung von Spaltungskinetiken mit an verschiedenen Stellen vorlinearisiertem pBW201 bzw. mit nicht vorlinearisiertem Plasmid als Substrat für den *McrBC*-Restriktionsverdau immer wieder zu den gleichen *McrBC*-Erkennungselementen, die somit bei Spaltungsereignissen der *McrBC*-Komplexe an pBW201 eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. So wurden neben der Vorlinearisierung von pBW201 mit *AvaI*, deren Auswertung oben beispielhaft gezeigt wurde, auch in anderer Art vorbehandelte pBW201-Plasmide in entsprechende Untersuchungen eingesetzt. Neben der zirkulären Form von pBW201 wurden pBW201-Plasmide als Substrat für die Untersuchung der DNA-Spaltung durch *McrBC* eingesetzt, die mit den Restriktionsenzymen *BamHI* (bereits oben erwähnt) bzw. *EcoRI* (erkennt und schneidet die in pBW201 singular vorkommende Sequenz 5'-G↓AATTC-3', wobei das G in der durchgängig in dieser Arbeit verwendeten Nummerierung die Positionsnummer *eins* besitzt) vorlinearisiert wurden.

RM		AvaI																							
RM	Pos.	48	270	362	880	1122	1235	1302	1333	1336	1737	1927	1953	2103	2267	2409	2412	2438	2673	2763	2766	2923	2926	2999	
	48		222	314	832	1074	1187	1254	1285	1288	1689	1879	1905	2055	2219										
	270			92	610	852	965	1032	1063	1066	1467	1657	1683	1833	1997										
	362				518	760	873	940	971	974	1375	1565	1591	1741	1905										
	880					242	355	422	453	456	857	1047	1073	1223	1387										
	1122						113	180	211	214	615	805	831	981	1145										
	1235							67	98	101	502	692	718	868	1032										
	1302								31	34	435	625	651	801	965										
	1333									3	404	594	620	770	934										
	1336										401	591	617	767	931										
	1737											190	216	366	530										
	1927												26	176	340										
	1953													150	314										
	2103														164										
AvaI	2267	2634	2856	2948	3466	3708	3821	3888	3919	3922	4323	4513	4539	4689	4853	142	145	171	406	496	499	656	659	732	
	2409	2492	2714	2806	3324	3566	3679	3746	3777	3780	4181	4371	4397	4547	4711		3	29	264	354	357	514	517	590	
	2412	2489	2711	2803	3321	3563	3676	3743	3774	3777	4178	4368	4394	4544	4708			26	261	351	354	511	514	587	
	2438	2463	2685	2777	3295	3537	3650	3717	3748	3751	4152	4342	4368	4518	4682			235	325	328	485	488	561		
	2673	2228	2450	2542	3060	3302	3415	3482	3513	3516	3917	4107	4133	4283	4447					90	93	250	253	326	
	2763	2138	2360	2452	2970	3212	3325	3392	3423	3426	3827	4017	4043	4193	4357						3	160	163	236	
	2766	2135	2357	2449	2967	3209	3322	3389	3420	3423	3824	4014	4040	4190	4354							157	160	233	
	2923	1978	2200	2292	2810	3052	3165	3232	3263	3266	3667	3857	3883	4033	4197								3	76	
	2926	1975	2197	2289	2807	3049	3162	3229	3260	3263	3664	3854	3880	4030	4194										73
	2999	1902	2124	2216	2734	2976	3089	3156	3187	3190	3591	3781	3807	3957	4121										

Abbildung 18: Tabelle zur Berechnung aller möglichen Fragmentgrößen aus Plasmidspaltungen an McrBC-Erkennungssequenzen am Substratbeispiel pBW201 · AvaI.

In der jeweils mit *RM* markierten ersten Zeile sowie ersten Spalte der Tabelle stehen die Positionsnummern aller in pBW201 vorhandener 5-Methylcytosinreste, die Bestandteil einer 5'-RM-3' Erkennungssequenz von McrBC sind (vgl. Plasmidkarte S. 46) bzw., mit *AvaI* markiert, die Schnittstelle von *AvaI* in pBW201 (Pos. 2267). In den einzelnen Feldern angegeben sind die daraus berechneten Differenzen der Positionen (Leserichtung: von der in der ersten Spalte angegebenen Position zu der in der ersten Zeile angegebenen Position). Diese Zahlen entsprechen den aus theoretischen Spaltungen an den jeweiligen McrBC-Erkennungssequenzen resultierenden Produktgrößen in der Einheit Basenpaare. Freie Felder zeigen an, dass die Kombination der entsprechenden Spaltpositionen nicht möglich ist, da sie in der gedachten Leserichtung durch die in diesem Beispiel vorhandene *AvaI*-Linearisierung getrennt sind. Über die berechneten Fragmentgrößen können mögliche Spaltpositionen für die Erzeugung eines erhaltenen Fragments bestimmter Größe abgeleitet werden. Dies ist hier beispielhaft für ein tatsächlich bei einer Spaltung von pBW201 · *AvaI* mit McrBC erhaltenes Fragment der Größe 1.9 kbp gezeigt: Grau unterlegt sind Felder, deren aus den jeweiligen McrBC-Erkennungssequenzen berechnete Fragmentgröße 1.9 kbp \pm 60 bp beträgt (vgl. Text).

Beide dieser Vorlinearisierungen sind besonders hinsichtlich des 1.9 kbp langen Fragmentes interessant, das bei der Untersuchung der McrBC-Spaltung zirkulären Plasmids sowie der *AvaI*-vorlinearisierten Form auftritt und durch *BamHI* mittig bzw. durch *EcoRI* randständig zerteilt wird. Dennoch weisen Auswertungen mit entsprechenden Excel-Tabellen, die die für die jeweiligen Substrate möglichen Fragmentgrößen und deren zugehörigen McrBC-Erkennungssequenzen angeben, stets auf McrBC-Spaltungen zwischen dem erwähnten McrBC-Erkennungselement bei Pos. 2923/2926 und dem durch 70 bp separierten Element bei Pos. 2999 (die angegebenen Ziffern beziehen sich wieder auf die Positionsnummer des 5-Methylcytosins) und dem nur durch 70 bp separierten Erkennungselement mit zwei McrBC-Erkennungssequenzen (Pos. 2923/2926) hin, sowie auf eine Spaltung in der Nähe des Erkennungselementes bei Pos. 48. Diese Befunde stützen die oben erwähnte Annahme, dass die Spaltung der Plasmid-DNA beidseitig des 1.9 kbp langen Abschnitts unabhängig

voneinander erfolgt (vgl. S. 174). Die Interpretation dieses Befundes ist, dass die Wechselwirkung der McrBC-Untereinheiten bzw. der -Komplexe über diese Distanz nicht ausreicht, um das 1.9 kbp lange Fragment effektiv spalten zu können. Vielmehr muss es die lokale Organisation der McrBC-Erkennungssequenzen beidseitig des 1.9 kbp langen, erkenntnissequenzfreien Abschnitts sein, die zu Spaltungen durch die Restriktionsendonuklease McrBC führt. Dieser Befund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher untersucht, was später vorgestellt wird.

Die genannte McrBC-Erkennungssequenz bei Pos. 48 der pBW201-Sequenz ist nach der Auswertung mit den geschilderten Excel-Tabellen verantwortlich für die Entstehung des oben erwähnten 2.6 kbp langen Zwischenprodukts bei der Spaltung *AvaI*-vorlinearisierten pBW201-Plasmids durch das McrBC-System. Nach dieser Auswertung handelt es sich bei dem 2.6 kbp langen Zwischenprodukt um den pBW201-Abschnitt *AvaI*-Schnittstelle → RM(Pos. 48). Auch in diesem Fall wird die Annahme durch erfolgreiche Spaltungen der genannten DNA mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI unterstützt (vgl. S. 175). Neben den genannten Erkennungselementen des McrBC-Systems sind noch einige weitere auffällig bezüglich der Zuordnung entstehender Fragmente bei der Spaltung linearisierten oder zirkulären Plasmids pBW201 durch das McrBC-Restriktionssystem. Dies gilt insbesondere für ein zwei McrBC-Erkennungssequenzen (Pos. 1333/1336; die angegebenen Ziffern beziehen sich, wie zuvor, auf die Positionsnummer der jeweiligen 5-Methylcytosinreste in der Plasmidkarte auf S. 46) enthaltendes Erkennungselement sowie für beide zu diesem benachbarten Elemente, die jeweils nur eine singuläre McrBC-Erkennungssequenz enthalten (Pos. 1302 bzw. Pos. 1737). Auch Spaltungen der Plasmid-DNA in der Nähe der McrBC-Erkennungselemente bei Pos. 270 und Pos. 362 ergeben in Kombination mit anderen Elementen bei den Spaltungsuntersuchungen auffällige Fragmentgrößenordnungen. Die eingehenderen Untersuchungen dieser Abschnitte werden später vorgestellt (vgl. Kapitel *Plasmid-Fragmente*, S. 186).

5.2.2. pBW201W

Das Plasmid pBW201W (s. S. 124) entspricht dem Plasmid pBW201, das in der einzigen dort vorhandenen Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Eco*RI (s. o.) eine Insertion der Sequenz des 61 bp langen Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 trägt (vgl. S. 134; die Ergebnisse der McrBC-Spaltungsexperimente mit dem isolierten Oligodesoxynukleotid sind ab Seite 194 aufgeführt). Die *Eco*RI-Schnittstelle liegt in pBW201 relativ randständig in

einem ca. 1.9 kbp langen Bereich, der durch die Methyltransferase *M.BsuFI* nicht methyliert wird (vgl. Abbildung 4, S. 46). Obwohl pBW201W nach der *in-vivo*-Methylierung durch die konstitutiv exprimierte Methylase *M.BsuFI* in Folge der Insertion der Sb61-Sequenz zwei Erkennungselemente des McrBC-Systems mehr enthält als pBW201, erwies sich pBW201W bei den hier durchgeführten Untersuchungen als ein schlechteres Substrat für das McrBC-Restriktionssystem als pBW201. Dies zeigte sich sowohl bei parallel durchgeführten Spaltungsversuchen vorlinearisierter Plasmidsubstrate als auch bei davon unabhängigen Spaltungsexperimenten mit aus den beiden Plasmiden (pBW201 bzw. pBW201W) isolierten, sich entsprechenden Fragmenten. Substrate aus pBW201W, die die 61 bp lange Insertion enthielten, wurden in allen Fällen um den Faktor 3 langsamer gespalten als entsprechende Substrate aus pBW201, die diese Insertion nicht enthielten.

Für die Analyse der Spaltung der Plasmidsequenzen durch McrBC wurden mit dem Restriktionsenzym *BamHI* vorlinearisierte Plasmide als Substrate für die Spaltreaktion eingesetzt. Die Restriktionsendonuklease *BamHI* erkennt und schneidet, wie oben erwähnt, die Sequenz 5'-G↓GATCC-3'. Diese Sequenz kommt sowohl im Plasmid pBW201 als auch in dessen direkten Abkömmling pBW201W nur einmal vor und befindet sich in beiden Fällen zentral im jeweiligen *hsmFI*-Gen, das für die Methyltransferase *M.BsuFI* codiert und von dieser nicht methyliert wird. Diese Schnittstelle ist ca. 916 und 986 bp (pBW201) bzw. 916 und 950 bp (pBW201W) von den jeweils nächsten McrBC-Erkennungssequenzen entfernt. Parallel angesetzte Spaltungskinetiken mit beiden Substraten zeigten bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C (mit 9 µM McrB und 4.5 µM McrC) keinen Unterschied in der Abfolge des erhaltenen Fragmentierungsmusters (der möglicherweise vorhandene Größenunterschied von 61 bp in den sich entsprechenden Fragmenten aus pBW201 und pBW201W ist mit dem bei der Auswertung der Kinetiken verwendeten Elektrophorese-Gelsystem, 1 bis 1.2 % Agarose, nicht berücksichtigt). Der nach 90 min Inkubationszeit erhaltene vollständige Verdau von *BamHI*-vorlinearisiertem pBW201 zeigte in der gelelektrophoretischen Analyse zwei Hauptproduktbanden, die DNA der Größenordnung > 0.9 bzw. ca. 1 kbp entsprachen. Das nach 30 min Inkubation erhaltene Spaltmuster von pBW201W entspricht etwa dem nach 10 min erhaltenen Produktmuster von pBW201. Gleiches gilt für das Ergebnis nach 90minütiger Inkubation von pBW201W mit McrBC, das dem Ergebnis der Inkubation von pBW201 mit McrBC nach 30 min entspricht. Demnach hat die Insertion der 61 bp langen Sequenz, die zwei McrBC-Erkennungselemente enthält, keinen entscheidenden Einfluss auf die Abfolge der Spaltungsereignisse von McrBC in diesen Plasmiden. Der Einfluss der zusätzlichen Erkennungssequenzen von McrBC auf Spaltungsreaktionen des

Restriktionssystem in der näheren Umgebung dieser Sequenzen wurde durch Analyse der Spaltung entsprechender Plasmidfragmente mit der McrBC-Nuklease überprüft.

Der hierfür ausgewählte Ausschnitt ist das 1364 bp lange *Bam*HI/*Asu*II-Restriktionsfragment aus pBW201 (bezeichnet als Pf1364; s. Karte der Plasmidfragmente von pBW201, S. 187) bzw. das entsprechende, 1425 bp lange Fragment aus pBW201W (bezeichnet als Pf1425). Beide Fragmente enthalten einen etwa 0.9 kbp langen randständigen Abschnitt, der keine McrBC-Erkennungssequenzen enthält. In dem sich anschließenden ca. 380 bp langen Bereich liegen bei Pf1364 drei McrBC-Erkennungselemente mit insgesamt drei McrBC-Erkennungssequenzen. In Pf1425 ist dieser Bereich durch die Insertion der Sequenz von Sb61-11.11 ca. 480 bp lang und enthält fünf McrBC-Erkennungselemente mit insgesamt sieben McrBC-Erkennungssequenzen. Das Ergebnis der Spaltung dieser Plasmidfragmente durch McrBC entspricht dem Ergebnis der Spaltungsexperimente der Plasmide, aus denen sie gewonnen wurden: Das Fragment Pf1425 aus pBW201W wird unter identischen Bedingungen etwa dreimal langsamer gespalten als das Fragment Pf1364 aus pBW201. Hinsichtlich der entstehenden Produktgrößen aus der McrBC-Spaltung der Plasmidfragmente besteht ein Unterschied zwischen Pf1364 und Pf1425, der bei der oben aufgeführten Betrachtung der Spaltung der kompletten, vorlinearisierten Plasmide nicht gezeigt werden konnte. Während das aus Pf1364 entstehende Hauptprodukt etwa 1 kbp groß ist und rechnerisch aus Durchspaltungen der DNA unmittelbar nach der ersten McrBC-Erkennungssequenz (diese entspricht der 5'-RM-3'-Sequenz bei Pos. 48 in pBW201) resultiert, entstehen aus Pf1425, das vor dieser Position die Sb61-Insertion enthält, zwei Hauptprodukte, die eine Länge von knapp über bzw. knapp unter 1 kbp besitzen und in etwa gleichen Mengen entstehen. Das kleinere Hauptprodukt entsteht rechnerisch aus McrBC-Spaltungen zwischen den beiden McrBC-Erkennungselementen der 61-bp-Insertion, das größere aus Spaltungen in der Nähe des dritten McrBC-Erkennungselementes, das dem ersten von Pf1364 aus pBW201 entspricht. Diese Untersuchungen zeigen den Einfluß zusätzlicher Erkennungssequenzen des McrBC-Systems auf die Spaltung von DNA-Molekülen, die bereits McrBC-Erkennungssequenzen besitzen und ein Substrat für dieses komplexe Restriktionssystem darstellen. In diesem Zusammenhang sind für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse weitere Analysen wichtig, die später vorgestellt werden sollen. Es handelt sich um die Klärung der Frage, wie sehr sich die 61-bp-Insertion von pBW201W in Form der isolierten Sequenz, d. h. als Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11, als spaltbares Substrat für das McrBC-Restriktionssystem eignet (s. S. 194) bzw. welchen Einfluss die

Insertion dieser Sequenz in einem anderen Sequenzkontext (ohne direkt benachbarte McrBC-Erkennungssequenzen) auf die Spaltungsergebnisse von McrBC besitzt (vgl. S. 184).

5.2.3. pMcrSb1

Das Plasmid pMcrSb1 wurde als Substrat in McrBC-Spaltungsexperimenten analog zu pBW201 verwendet. Als Derivat des Plasmids pBW201 besitzt pMcrSb1 dessen singulären Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *AvaI* und *BamHI* sowie nach der *in vivo* erfolgten Methylierung durch *M.BsuFI* 15 der 18 in pBW201 vorhandenen Erkennungselemente des McrBC-Restriktionssystems (vgl. S. 125). Durch die Substitution des *EcoRI/AsuII*-Fragmentes von pBW201 durch einen etwas längeren Abschnitt einer DNA, die nicht durch *M.BsuFI* methyliert werden kann, fehlen dem Plasmid pMcrSb1 die ersten drei McrBC-Erkennungselemente von pBW201, und der methylierungsfreie Bereich, der das *hsmFI*-Gen enthält, erweitert sich von 1.9 kbp auf eine Länge von etwa 3 kbp (vgl. Plasmidkarten von pBW201 und pMcrSb1 auf S. 128). Alle anderen in pMcrSb1 vorhandenen McrBC-Erkennungselemente entsprechen in ihrer Ausbildung und in ihren Abständen zueinander der Situation von pBW201 (vgl. Plasmidkarte auf S. 170).

Hier durchgeführte Spaltungskinetiken mit McrBC, bei denen zirkuläres bzw. durch *AvaI* vorlinearisiertes Plasmid pMcrSb1 als Substrat verwendet wurde, zeigten die Entstehung eines Hauptproduktes von knapp über 3 kbp Länge. Die Bestimmung der für die Entstehung dieses Fragmentes benutzten Schnittstellen, wie sie auch für Experimente mit pBW201 als McrBC-Substrat durchgeführt wurde (vgl. S. 176), identifiziert die McrBC-Erkennungselemente bei Pos. 3199/3202 bzw. bei Pos. 3275 als Bereiche, in denen die Plasmid-DNA durch McrBC gespalten wurde. Diese Elemente sind mit den schon in pBW201 bestimmten Erkennungselementen bei Pos. 2923/2926 und Pos. 2999 identisch. Das für die Entstehung des ca. 3 kbp langen Produkts verantwortliche Erkennungselement ist nach dieser Bestimmung die 5'-RM-3'-Sequenz bei Pos. 1156 in pMcrSb1, die der Pos. 880 in pBW201 entspricht. Unterstützt wird diese Zuordnung durch die Beobachtung, dass das ca. 3 kbp lange Produkt nicht entstand, wenn durch *BamHI* oder durch *EcoRI* vorlinearisiertes pMcrSb1-Plasmid als Substrat für die Spaltreaktion verwendet wurde, sondern zwei Produkte, die eine Länge von ca. 2.1 kbp bzw. ca. 0.9 kbp aufweisen. Diese Produkte entstanden ebenfalls, wenn die *BamHI*-Spaltung des Plasmidsubstrates pMcrSb1 vor der Inkubation der DNA mit McrBC erfolgte. Auch hier kann demnach, analog zu pBW201, die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Spaltung der Plasmid-DNA beidseitig des etwa 3 kbp langen, methylierungsfreien

Abschnitts weitestgehend unabhängig voneinander erfolgt. Vielmehr erlauben die lokalen Anordnungen der McrBC-Erkennungselemente beidseitig dieses Abschnitts die Spaltung der Plasmid-DNA durch McrBC. Dabei ist die Organisation der McrBC-Erkennungselemente vor (*vor* im Sinne einer in Richtung aufsteigender Nummerierung der Basenpaare gedachten Orientierung) dem 3 kbp langen Bereich in pMcrSb1 identisch mit der Situation in pBW201, während nach diesem Abschnitt DNA-Spaltung durch McrBC in der Nähe einer McrBC-Erkennungssequenz erfolgt, die sich in einem etwas anderen lokalen Kontext befindet als bei pBW201. Das in beiden Plasmiden jeweils erste McrBC-Erkennungselement nach dem längsten methylierungsfreien Abschnitt ist 222 bp (pBW201) bzw. 242 bp (pMcrSb1) vom jeweils zweiten McrBC-Element entfernt.

Abgesehen von dem beschriebenen ca. 3 kbp langen Hauptprodukt und dessen *Bam*HI- bzw. *Eco*RI-Fragmenten entspricht das aus einer Spaltung von pMcrSb1 durch McrBC erhaltene Spaltmuster dem aus der entsprechenden Spaltung von pBW201 resultierenden Ergebnis. Das breite Spektrum an erhaltenen Produktgrößen läßt, wie bei pBW201, eine Kartierung aller von McrBC verwendeten Spaltstellen im Plasmid nicht zu. Vor allem kleinere Spaltprodukte (< 2.5 kbp) können durch eine Vielzahl möglicher Spaltpositionen entstehen. Die nahe liegende Vermutung, dass alle in den Plasmiden vorhandenen McrBC-Erkennungselemente für die Plasmidspaltungen durch das McrBC-System eine Rolle spielen, wird durch Spaltungsexperimente mit isolierten Plasmidabschnitten als Substrat für die McrBC-Restriktionsendonuklease näher untersucht (s. Kapitel *Plasmid-Fragmente*, S. 186).

5.2.4. pMcrSb2 und pMcrSb3

Die beiden Plasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 sind direkte Derivate des Plasmids pMcrSb1, die in dessen *Eco*RI-Schnittstelle eine Insertion von 61 bp besitzen (vgl. S. 128). Durch die Einführung zweier McrBC-Erkennungselemente durch die Insertion wird der etwa 3 kbp lange Abschnitt von pMcrSb1, der keine McrBC-Erkennungselemente besitzt, in einen ca. 1.9 kbp langen Abschnitt, der das *hsmFI*-Gen trägt, und in einen ca. 1.1 kbp langen Abschnitt unterteilt. Um die McrBC-Spaltbarkeit der sich in einem Plasmidkontext befindlichen Insertions-DNA (vgl. Kapitel *Sb6I-11.11*, S. 194) und den Einfluss zusätzlicher McrBC-Erkennungselemente auf die Plasmidspaltung durch McrBC zu überprüfen, wurden Kinetiken durchgeführt, bei denen, analog zu pBW201 und pMcrSb1, sowohl zirkuläre als auch durch die Restriktionsenzyme *Bam*HI bzw. *Ava*I vorlinearisierte DNA beider Plasmide als Substrate für die Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem eingesetzt wurde (eine

"Vorlinearisierung" durch *EcoRI* würde die Insertion von 61 bp eliminieren). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigen zum Einen keinen Unterschied in der Spaltung von pMcrSb2 im Vergleich zu pMcrSb3, zum Anderen entsprechen die für beide Plasmide erhaltenen Resultate im Wesentlichen den bei den McrBC-Spaltungen des Plasmids pMcrSb1 erhaltenen Ergebnissen. Sowohl die Spaltung zirkulärer als auch die Spaltung *AvaI*-linearisierter Plasmide durch McrBC führt zu einem etwa 3 kbp langen Hauptprodukt, sowohl für pMcrSb2 als auch für pMcrSb3. Dieses Hauptprodukt besitzt gleiche Eigenschaften bezüglich der Spaltbarkeit durch *BamHI* wie das bei der McrBC-Spaltung von pMcrSb1 erhaltene 3-kbp-Fragment. Dies bedeutet, dass dieses Fragment das *hsmFI*-Gen enthält, hinter dem die Insertion der 61 bp langen Sb61-Sequenz erfolgte. Zusätzliche Spaltprodukte aus der Inkubation der zirkulären bzw. *AvaI*-linearisierten Plasmid-DNA mit McrBC, die eine Länge von ca. 1.9 kbp bzw. ca. 1.2 kbp besitzen, zeigten sich bei der gelanalytischen Auswertung der Kinetiken mit pMcrSb2 und pMcrSb3 lediglich in Spuren. Fragmente dieser Größe würden jedoch bei einer effektiven Spaltung der Plasmid-DNA durch McrBC in der Nähe der durch die Insertion eingeführten McrBC-Erkennungselemente in deutlich größerem Umfang entstehen. Entsprechende Resultate zeigten auch Spaltungen der *BamHI*-vorlinearisierten Plasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 mit der McrBC-Nuklease. Auch hier wurden im Wesentlichen durch die McrBC-Spaltung Produkte erzeugt, die auch bei der entsprechenden Spaltung von pMcrSb1 entstanden. Die bei einer Spaltung der *BamHI*-linearisierten Plasmid-DNA durch McrBC in der Nähe der beiden zusätzlichen McrBC-Erkennungselemente der Insertionssequenz zu erwartenden ~ 0.9 kbp bzw. etwa 1.2 kbp langen Produkte erschienen relativ zur Menge des erhaltenen 2.1 kbp langen Fragments (vgl. Ergebnis der Spaltung von pMcrSb1, S. 183) nur in einem geringen Umfang. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden durch die Insertion der 61 bp langen Sequenz von Sb61-11.11 in pMcrSb1 eingeführten McrBC-Erkennungselemente zwar einen Einfluss auf die Plasmidspaltung durch das McrBC-System besitzen, aber nur in einem geringen Ausmaß. Möglicherweise ist die Distanz der inserierten McrBC-Erkennungselemente zu den nächst benachbarten in pMcrSb2 bzw. pMcrSb3 in Relation zu dem gegebenen Verteilungsmuster der McrBC-Erkennungssequenzen zu groß, um eine hinsichtlich der Plasmidspaltung effektive Wechselwirkung der Untereinheiten des McrBC-Systems über diese Abstände zu ermöglichen. Desweiteren kommt in Betracht, dass die beiden inserierten McrBC-Erkennungselemente der Sb61-Sequenz für sich genommen keine effektive Spaltung der DNA durch McrBC zulassen. Die Untersuchung der Spaltung entsprechender, isolierter Plasmidfragmente aus pMcrSb2 und pMcrSb3, vergleichend mit einem solchen aus pMcrSb1, sollte hierüber Auskunft geben. Die

Ergebnisse der diese Überlegungen klärenden Experimente werden in dem Kapitel *Sb61-11.11* (s. S. 194) im Zusammenhang mit der Untersuchung der McrBC-Spaltung der isolierten Insertions-DNA (Sb61-11.11) vorgestellt.

5.3. Plasmid-Fragmente

Wie im voranstehenden Kapitel beschrieben, stellt das durch die C5-Methyltransferase *M.BsuFI* methylierte Plasmid pBW201 ein Substrat für die Restriktionsendonuklease McrBC dar, das in Folge des Vorhandenseins mehrerer McrBC-Erkennungssequenzen (vgl. Plasmidkarten von pBW201 auf S. 46 sowie S. 170) vom McrBC-Restriktionssystem an einer Vielzahl von Positionen gespalten werden kann. Das sich aus der Spaltung des Plasmids durch McrBC ergebende Fragmentmuster hängt, wie oben dargestellt, davon ab, ob und an welcher Stelle die zirkuläre Plasmid-DNA vorlinearisiert wurde. Die Anzahl an McrBC-Erkennungssequenzen ist in diesen vorlinearisierten Substraten immer gleich, aber ihre relative Position zu den Enden der linearen DNA verschieden. Im Folgenden werden die Resultate aus McrBC-Spaltungsuntersuchungen mit isolierten Restriktionsfragmenten von pBW201 und der in dieser Arbeit generierten pBW201-Derivatplasmide gezeigt. Die untersuchten Plasmid-Fragmente unterscheiden sich, bedingt durch ihre Herkunft, sowohl in ihrer Größe als auch in der Anzahl der in ihnen vorkommenden McrBC-Erkennungssequenzen. Die Plasmide, die für die Herstellung der entsprechenden Fragmente verwendet wurden, wurden vor ihrer Aufreinigung aus *E. coli* TC410 *in vivo* durch die konstitutiv exprimierte C5-Methyltransferase *M.BsuFI* methyliert. Die Aufreinigung der aus enzymatischen Spaltungen mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gewonnenen Plasmidfragmente erfolgte jeweils mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese. Eine Übersicht der untersuchten Plasmidfragmente aus pBW201 und pMcrSb2 zeigt Abbildung 19. Zusätzlich zu den Plasmidfragmenten, deren Untersuchung nachfolgend beschrieben wird, werden weitere Fragmente an anderer Stelle im entsprechenden thematischen Zusammenhang diskutiert. Es handelt sich hierbei um das oben beschriebene Fragment Pf1364 aus pBW201 und das diesem Abschnitt entsprechende Fragment Pf1425 aus pBW201W (s. S. 182) sowie um die im Kapitel *Sb61-11.11* (s. S. 196) beschriebenen Fragmente Pf1022 (aus pMcrSb1) und Pf1083 (aus pMcrSb2 sowie aus pMcrSb3). Desweiteren wurde das durch die Methyltransferase *M.MspI* *in vitro* modifizierte Plasmidfragment Pf1793 aus pHisVDE Δ Splice hinsichtlich seiner Eignung als Spaltsubstrat des McrBC-Restriktionssystems überprüft (vgl. S. 131).

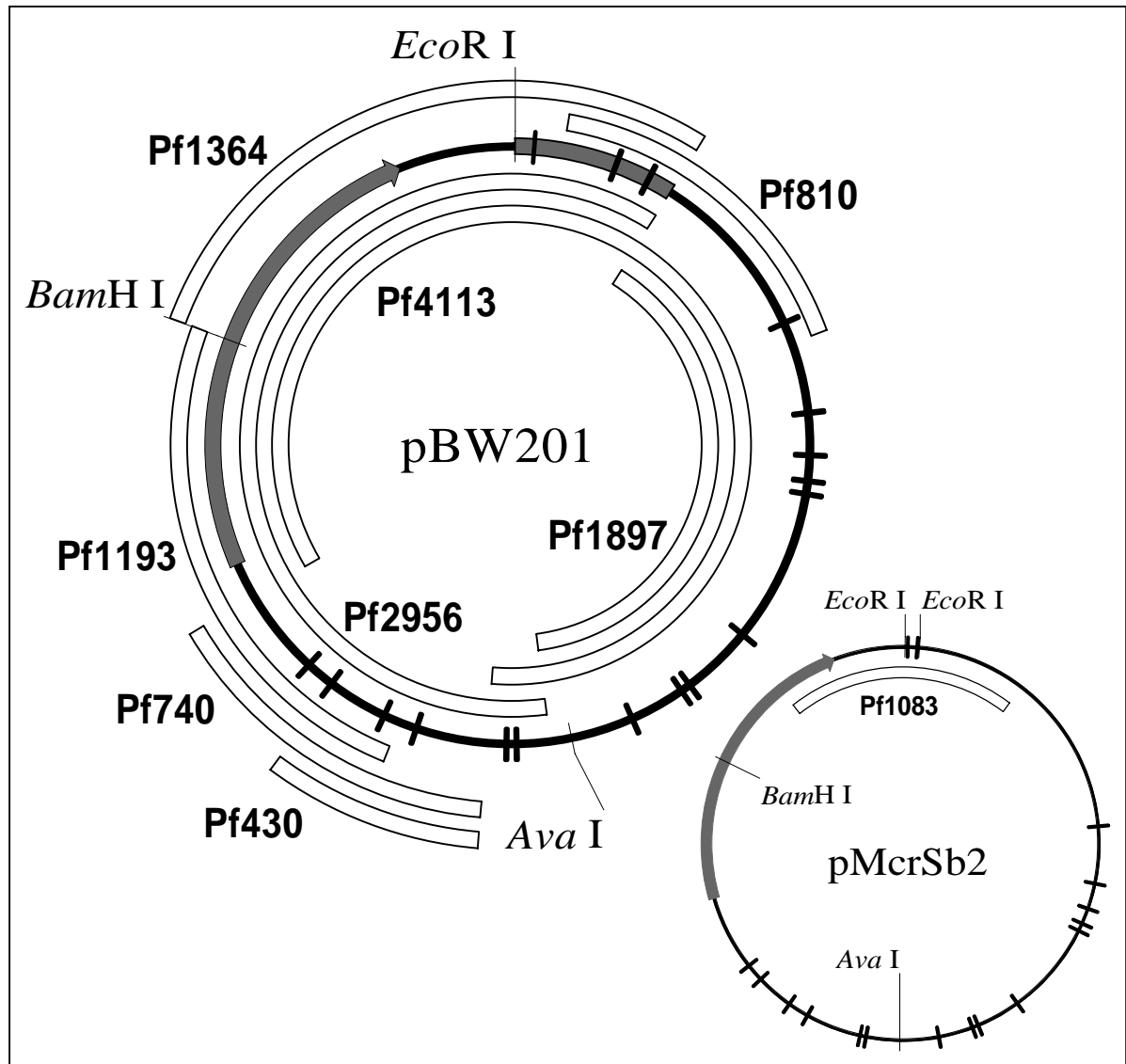


Abbildung 19: Lokalisation von Abschnitten in pBW201 bzw. in pMcrSb2, die in dieser Arbeit als isolierte Fragmente untersucht wurden.

Die Plasmide pBW201 und pMcrSb2 sind schematisch jeweils als schwarze Kreislinien dargestellt, auf denen durch kurze Querstriche die relative Position der McrBC-Erkennungselemente angegeben ist (vgl. Abbildung 4 auf S. 46 sowie Abbildung 15 auf S. 170; pBW201 ist im Verhältnis zu pMcrSb2 vergrößert dargestellt; pMcrSb2 entspricht pMcrSb1 mit einer Insertion von 61 bp in dessen *EcoRI*-Schnittstelle, vgl. S. 128). Die grauen Pfeile bezeichnen die Position des *hsmFI*-Gens. Bei pBW201 zeigt der auf der Kreislinie liegende graue Balken das *EcoRI/AsuII*-Fragment an, das für die Generierung von pMcrSb1 entfernt wurde (vgl. S. 125). Für die Restriktionsenzyme *AvaI*, *BamHI* und *EcoRI* ist die relative Lage ihrer Schnittstellen in beiden Plasmiden angegeben. Die innerhalb bzw. außerhalb der Plasmid-Kreise eingezeichneten Balken zeigen an, welchem Abschnitt aus dem betreffenden Plasmid das jeweils in der Abbildung benannte Fragment entspricht. Die eingezeichneten, aus pBW201 stammenden Fragmente besitzen folgende, durch Restriktionsenzyme erzeugte Enden (vorderes/hinteres Ende; Orientierung im Uhrzeigersinn): *EheI/Eco47III* (Pf430), *EheI/SnaBI* (Pf740), *RsaI/RsaI* (Pf810), *NruI/BamHI* (Pf1193), *BamHI/AsuII* (Pf1364), *AsuII/StyI* (Pf1897), *StyI/AsuII* (Pf2950) bzw. *SnaBI/EheI* (Pf4113). Pf1083 aus pMcrSb2 besitzt die Enden *HpaI/HpaI*.

5.3.1. Größere Plasmidfragmente

Die hier gesammelt besprochenen Restriktionsfragmente (Pf1897, Pf2956, Pf4113) sind mehrere kbp lang und besitzen mindestens neun McrBC-Erkennungssequenzen. Ein Beispiel ist das 1897 bp große *AsuII/StyI*-Fragment aus pBW201 (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 187; *AsuII* erkennt und schneidet die Sequenz 5'-TT↓CGAA-3', *StyI* 5'-C↓CWWGG-3'). Diese als Pf1897 bezeichnete DNA enthält neun McrBC-Erkennungselemente, die aus jeweils einer 5'-RM-3'-Sequenz bestehen. Lediglich das mittlere Element besteht aus einer *M.BsuFI*-Erkennungssequenz, in der beide methylierte Cytosinreste 3' zu einem Purin stehen und somit zwei McrBC-Erkennungssequenzen in einem Element bilden. Entsprechend der Nomenklatur der für die in dieser Arbeit hergestellten PCR-Produkte und synthetischen Oligodesoxynukleotide (vgl. S. 133) ist der über die Verteilung der McrBC-Erkennungssequenzen auf die beiden DNA-Strängen Auskunft gebende Name dieser DNA Pf1897-10.10.01.01.11.10.10.10.01, wobei das erste McrBC-Erkennungselement rechnerisch² 453 bp vom linken Ende der DNA entfernt ist. Die von links nach rechts aufeinanderfolgenden McrBC-Erkennungselemente sind 240, 112, 65, 28, 398, 188, 24 bzw. 148 bp voneinander getrennt, wobei zwischen dem letzten Element und dem rechten Ende der DNA rechnerisch 217 bp liegen. Die so strukturierte DNA ist ein Spaltungssubstrat des McrBC-Restriktionssystems, wobei 110 ng Pf1897 bei 28 °C innerhalb von 15 min von 3 µM McrB und 0.3 µM McrC soweit durchgespalten wurden, dass kein ungespaltenes Ausgangssubstrat mehr vorhanden war. Das dabei entstehende Hauptprodukt war etwa 850 bp groß, ein Hinweis darauf, dass das McrBC-System diese DNA möglicherweise bevorzugt zwischen den beiden 65 bp entfernten Erkennungssequenzen schneidet.

Ähnlich effektiv werden zwei andere lange pBW201-Fragmente durch das McrBC-Restriktionssystem abgebaut. Es handelt sich hierbei um die Fragmente Pf4113 und Pf2956 (vgl. Karte der Restriktionsfragmente von pBW201 auf S. 187). Dem 4113 bp langen Fragment Pf4113 fehlen nur 740 bp des vollständigen Plasmids pBW201 (dieser fehlende Teil, Pf740, wurde ebenfalls untersucht; s. S. 190). Es entsteht durch Restriktionsspaltung von pBW201 mit den Restriktionsendonukleasen *SnaBI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-TAC↓GTA-3') und *EheI* (5'-GGC↓GCC-3'). Das andere Fragment, Pf2956, entspricht

² Da die zur Gewinnung der gewünschten Plasmidfragmente verwendeten Restriktionsendonukleasen meist DNA-Enden mit unterschiedlichem Einzelstrang-Überhang erzeugen, beziehen sich hier in der Einheit *Basenpaare* angegebene Abstände zu einem Ende des Fragments rechnerisch auf die Schnittstelle des jeweils verwendeten Restriktionsenzym im oberen Strang. Gleiches gilt auch für die Längenangaben von Restriktionsfragmenten.

pBW201 abzüglich des oben genannten *AsuII/StyI*-Fragments Pf1897 (s. S. 188). Sowohl Pf4113 als auch Pf2956 enthalten das für die *M.BsuFI*-Methyltransferase codierende Gen *hsmFI*, das durch die Methyltransferase nicht methyliert wird und somit auch keine Erkennungssequenzen des McrBC-Systems enthält (vgl. Abbildung 19, S. 187). Der etwa 1.9 kbp umfassende Abschnitt von pBW201, der frei von McrBC-Erkennungssequenzen ist, ist in Pf2956 vollständig erhalten und liegt im zentralen Bereich der DNA. Vor diesem Abschnitt befinden sich sechs Erkennungselemente des McrBC-Systems (drei davon mit zwei McrBC-Erkennungssequenzen), dahinter drei Elemente. Der methylierungsfreie Abschnitt von pBW201 liegt in Pf4113 randständig und ist nicht vollständig erhalten (1671 bp vom linken Ende zur ersten McrBC-Erkennungssequenz). Von den 14 über einen Bereich von etwa 2.4 kbp verteilten Erkennungselementen des McrBC-Systems enthalten nur zwei Elemente zwei Erkennungssequenzen. Trotz der genannten Unterschiede werden beide DNA-Substrate durch das McrBC-Restriktionssystem vollständig abgebaut. Die sich aus dem Restriktionsverdau mit McrBC ergebenden Hauptprodukte sind im Falle von Pf2956 ca. 1.9 kbp lang, im Falle von Pf4113 etwa 1.7 kbp. Damit bestätigen sich die Aussagen, die aus den McrBC-Spaltungen der vollständigen Plasmide (s. S. 169 ff.) bezüglich der Verwendung des McrBC-Erkennungselementes bei Pos. 48 in pBW201 bei der Spaltung dieses Plasmids durch das McrBC-Restriktionssystem gemacht wurden: Auch ohne den Einfluss der beiden letzten McrBC-Erkennungselemente vor dem 1.9 kbp langen methylierungsfreien Abschnitt (Pos. 2923/2926 bzw. Pos. 2999), die in Pf4113 nicht vorhanden sind, spaltet das McrBC-Restriktionssystem die aus pBW201 stammende DNA in der Nähe der ersten McrBC-Erkennungssequenz nach dem 1.9 kbp langen, methylierungsfreien Abschnitt (Pos. 48 in pBW201, bzw. das erste McrBC-Element in Pf4113). Dieses Ergebnis konnte hier später durch McrBC-Spaltung des Restriktionsfragments Pf1364 bestätigt werden, das nur diese drei ersten McrBC-Erkennungssequenzen aus pBW201 enthält (vgl. S. 182).

5.3.2. Pf430

Der Restriktionsverdau von pBW201 mit den Restriktionsenzymen *EheI* (s. S. 188) und *Eco47III* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-AGC↓GCT-3') lieferte das gewünschte 430 bp lange Fragment Pf430 (vgl. Restriktionskarte von pBW201 auf S. 187). Diese DNA enthält lediglich zwei Erkennungselemente des McrBC-Restriktionssystems, von denen das erste 183 bp Abstand zum linken Ende der DNA besitzt und nur eine McrBC-Erkennungssequenz (im oberen Strang) enthält. Das andere Element besitzt, resultierend aus

der *M.Bsu*FI-Methylierung in entsprechendem Sequenzkontext, zwei schräg versetzt sich gegenüberstehende McrBC-Erkennungssequenzen und ist durch 151 bp vom rechten Ende separiert. Beide Erkennungselemente sind durch 88 bp getrennt. Das Vorhandensein zweier McrBC-Erkennungselemente, die durch eine dem in der Literatur beschriebenen Optimum sehr nahe kommende Distanz von 88 bp getrennt auf der linearen DNA lokalisiert sind, macht Pf430 zumindest theoretisch zu einem durch das McrBC-System gut restringierbaren Substrat. Trotz verschiedener Bedingungen (Erhöhung der McrBC-Konzentrationen bis 9.5 μ M McrB bzw. 4.5 μ M McrC) konnten jedoch McrBC-spezifische Spaltprodukte von Pf430 nur in Spuren nachgewiesen werden, während das Plasmid pBW201, aus dem Pf430 gewonnen wurde, unter identischen Bedingungen sehr gut durch das McrBC-System spaltbar war. Dieses Ergebnis ist besonders im Vergleich mit dem Resultat der Spaltungsversuche mit dem Plasmidfragment Pf740 als Substrat für McrBC interessant, das nachstehend beschrieben wird. Für die Spaltung des Substrats Pf430 wurde zudem eine allosterische Aktivierung der McrBC-Endonuklease versucht (s. Kapitel *In-trans-Aktivierung*, S. 208).

5.3.3. Pf740

Das Plasmidfragment Pf740 ist das 740 bp große *EheI/Sna*BI-Fragment, das, methyliert durch *M.Bsu*FI, vier McrBC-Erkennungselemente enthält. Die DNA Pf740 entspricht einem entsprechend der pBW201-Sequenz verlängerten Fragment Pf430 (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 187). Die beiden äußeren Elemente besitzen jeweils nur eine, im oberen Strang liegende Erkennungssequenz von McrBC in Form von 5'-GM-3' (M = 5-Methylcytosin) bzw. 5'-AM-3', die beiden inneren Elemente bestehen aus jeweils zwei McrBC-Erkennungssequenzen in Form von 5'-GM-3', da sich in beiden Fällen in jeweils beiden Strängen 5' zur *M.Bsu*FI-Erkennungssequenz ein Guanosinrest befindet. Der über die Lage der McrBC-Erkennungssequenzen Auskunft gebende Name dieser DNA (vgl. S. 133) ist also Pf740-10.11.11.10, wobei das erste Erkennungselement 183 bp vom linken Ende, das letzte 229 bp vom rechten Ende der linearen DNA entfernt ist. Untereinander sind die aufeinanderfolgenden Erkennungselemente durch 88, 154 bzw. 70 bp voneinander getrennt. Das so strukturierte DNA-Substrat ist durch McrBC spaltbar: 3 μ M McrB und 4 μ M McrC spalten das Substrat bei Anwesenheit von 1 mM GTP innerhalb 90 min bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C vollständig durch. Als deutliche Hauptprodukte entstehen dabei Fragmente mit einer Größe von ca. 250 bp. Ein Zwischenprodukt (< 500 bp) wird dabei nur in geringem Umfang gebildet. Das bedeutet, dass die DNA durch die McrBC-

Restriktionsendonuklease sowohl zwischen den beiden ersten McrBC-Erkennungselementen gespalten wird, als auch zwischen den beiden letzten. Dies ist verglichen mit den durch Verwendung von Pf430 als Substrat für das McrBC-System erhaltenen Resultaten sehr erstaunlich. Das Fragment Pf430, welches identisch ist mit den ersten 430 bp von Pf740, die die ersten beiden McrBC-Erkennungselemente enthalten, wird als isolierte Sequenz kaum durch McrBC gespalten (s. S. 189).

5.3.4. Pf810

Das aus pBW201 stammende Plasmidfragment Pf810 ist das mit 810 bp kleinere Fragment, das man durch Restriktionsspaltung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* (erkennt und schneidet die in pBW201 zweimal vorkommende Sequenz 5'-GT↓AC-3') erhält. (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 187). Die DNA enthält drei McrBC-Erkennungselemente, die dem zweiten, dritten und vierten McrBC-Element aus pBW201 entsprechen (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 187). Die drei McrBC-Erkennungselemente von Pf810 besitzen aus der Methylierung der jeweiligen *M.BsuFI*-Erkennungssequenz jeweils eine Erkennungssequenz des McrBC-Restriktionssystems, wobei die ersten beiden McrBC-spezifischen Sequenzen (jeweils 5'-AM-3') im unteren DNA-Strang liegen und durch 90 bp getrennt werden. Die erste McrBC-Erkennungssequenz ist durch 143 bp vom linken Ende der linearen DNA getrennt (in pBW201 liegt 78 bp weiter in dieser Richtung das erste McrBC-Erkennungselement *Pos. 48*, das im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse der Plasmidspaltungen durch McrBC schon erwähnt wurde). Die dritte McrBC-Erkennungssequenz (5'-GM-3') liegt im oberen Strang und ist von der zweiten durch 515 bp, vom rechten Ende des Fragments durch 56 bp getrennt. Obwohl zwei der drei vorhandenen Erkennungssequenzen des McrBC-Systems durch 90 bp separiert sind und somit ein Abstand vorliegt, der dem beschriebenen Optimum von 40 bis 80 bp sehr nahe kommt, läßt sich eine Spaltung dieser DNA durch das McrBC-System nur in Spuren nachweisen. Das bei der Spaltung durch McrBC entstehende Hauptprodukt weist eine Größe von etwa 600 bp auf. Ein Produkt dieser Größenordnung kann dadurch entstehen, dass die DNA zwischen den beiden ersten, 90 bp voneinander entfernten McrBC-Erkennungssequenzen geschnitten wird, und zwar etwa 25 bis 65 bp von diesen Erkennungssequenzen entfernt.

5.3.5. Pf1193

Die DNA Pf1193 ist das durch die Restriktionsendonukleasen *NruI* (erkennt und spaltet die Sequenz 5'-TCG↓CGA-3') und *BamHI* (s. o.) entstehende, 1193 bp lange Restriktionsfragment aus dem Plasmid pBW201 (vgl. Restriktionskarte von pBW201 auf S. 187). Dieses Plasmidfragment beherbergt die drei letzten McrBC-Erkennungselemente, die vor dem ca. 1.9 kbp langen methylierungsfreien Abschnitt von pBW201 liegen, der das *hsmFI*-Gen enthält. Zwischen der *NruI*-Schnittstelle am linken Ende der DNA und dem ersten McrBC-Erkennungselement liegen 41 bp. Die beiden vorderen McrBC-Erkennungselemente enthalten durch die *M.BsuFI*-Methylierung jeweils zwei McrBC-Erkennungssequenzen und sind durch 154 bp voneinander separiert. Das dritte Erkennungselement enthält nur eine McrBC-Erkennungssequenz und ist durch 76 bp vom zweiten Element und durch 915 bp vom rechten Ende der DNA distanziert. Eine Inkubation dieser DNA mit 6 µM McrB und 1.5 µM McrC ergab eine McrBC-spezifische Spaltung des Substrates. Nach einer Stunde bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C waren 50 % des Substrates durch McrBC gespalten, wobei das dabei entstandene Hauptprodukt eine relativ definierte Länge von ca. 940 bp besitzt. Dieses Produkt resultiert aus einer Spaltung der DNA durch McrBC zwischen den beiden durch 70 bp separierten Erkennungselementen. Für diesen Bereich wurden schon McrBC-Spaltungen durch Verwendung des pBW201-Fragments Pf740 gezeigt, die bei diesem Substrat allerdings effektiver erfolgten als bei Pf1193 (vgl. S. 190). Aber auch zwischen den beiden vorderen McrBC-Erkennungselementen kommt es zu Spaltungen durch die McrBC-Endonuklease, wie das Auftreten eines Zwischenprodukts von ca. 1.1 kbp Länge während der Spaltungsreaktion zeigt.

5.4. PCR-Produkte und Oligodesoxynukleotide

Für bestimmte experimentelle Fragestellungen im Rahmen der biochemischen Charakterisierung einer Restriktionsendonuklease sind kurze DNA-Moleküle, die eine singuläre Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym besitzen, ein ideales Hilfsmittel. Während für die Untersuchung der DNA-Spaltung durch Typ II Restriktionsendonukleasen ein Oligodesoxynukleotid mit einer Länge von < 20 bp mit einer singulären, zentralen Erkennungssequenz des jeweils zu untersuchenden Restriktionsenzym häufig als Substrat für die Beantwortung vieler Fragestellungen ausreichend ist, besitzen andere Restriktionssysteme weitergehende Ansprüche an ein *minimales* Spaltsubstrat. Wie Restriktionsenzyme der Typengruppen I und III benötigt auch das McrBC-System mindestens zwei Erkennungs-

sequenzen in linearen DNA-Substraten, um eine hydrolytische Spaltung der DNA erzielen zu können. Dazu müssen beide Erkennungssequenzen im Falle von McrBC als zusätzliche Anforderung eine gewisse Distanz zueinander haben, nämlich eine Entfernung von mindestens 40 und, nach dem Stand des Wissens zu Beginn dieser Arbeit, maximal etwa 80 bp zueinander. Der erste Versuch dieser Arbeit, ein Oligodesoxynukleotid durch McrBC zu spalten, wurde mit dem eingangs zum Kapitel *Untersuchungen zur DNA-Spaltung* beschriebenen Substrat Sb73-10.01.00 unternommen. Wie oben beschrieben (vgl. S. 167), ließ sich diese 73 bp lange DNA, die zwei durch 51 bp separierte Erkennungssequenzen des McrBC-Systems enthält, zwar durch das McrBC-System spalten, die dabei erzielte Ausbeute an Spaltprodukten war allerdings verschwindend gering. Das Phänomen, dass eine DNA zwar alle in der Literatur beschriebenen Kriterien eines guten Substrats für eine Spaltung durch McrBC erfüllt, tatsächlich aber dennoch nur in sehr geringem Umfang durch McrBC gespalten wird, wurde in dieser Arbeit durch Verwendung verschiedener kurzer DNA-Moleküle als Spaltsubstrat der McrBC-Restriktionsendonuklease näher untersucht.

5.4.1. DNA der Gruppen Sb82 und Sb99

Die 82 bp langen, von ihrer Basensequenz her fast identischen DNA-Moleküle der Sb82-Gruppe (s. S. 138) besitzen, mit Ausnahme der unmethylierten Kontrollmoleküle Sb82a-00.00 und Sb82b-00.00, zwei Erkennungselemente des McrBC-Systems, die aus jeweils einer singulären McrBC-Erkennungssequenz der Form 5'-GM-3' (M = 5-Methylcytosin) bestehen. Beide Erkennungssequenzen sind durch ihre auf beide DNA-Stränge verteilte Position gegenläufig orientiert und durch 47 bp (Sb82a-10.01, vgl. S. 138) bzw. durch 51 bp (Sb82b-10.01, vgl. S. 139) voneinander getrennt. Die beiden jeweils vorderen 5'-GM-3' Sequenzen liegen, in unterschiedlicher direkter Sequenzumgebung, 12 bp vom linken Ende der DNA entfernt, während die jeweils hinteren Erkennungssequenzen, ebenfalls in unterschiedlicher direkter Sequenzumgebung, 15 bzw. 19 bp vom rechten DNA-Ende distanziert sind. Obwohl beide Moleküle jeweils zwei Erkennungssequenzen des McrBC-Systems besitzen, die in beiden Fällen in dem in der Literatur als notwendig beschriebenen Abstand von 40 bis 80 bp liegen, konnte in beiden Fällen eine Spaltung durch das McrBC-System nicht nachgewiesen werden.

Anders verhält sich die DNA Sb99-20.02 als Substrat für das McrBC-System. Obwohl die diesem 99 bp langen Molekül zugrunde liegende Sequenz im Wesentlichen der Sb82-DNA entspricht (vgl. S. 141), kann durch Inkubation von Sb99-20.02 mit McrBC eine DNA-

Spaltreaktion durch den Enzymkomplex erreicht werden. Der grundlegende Unterschied der Sb99-DNA zu den genannten Sb82-Molekülen ist, abgesehen von der leicht vergrößerten Gesamtlänge, das verstärkte Vorkommen von McrBC-Erkennungssequenzen. Insgesamt sind in dieser DNA vier solcher Erkennungssequenzen zu finden, von denen jeweils zwei sehr eng benachbart auf einem Strang lokalisiert sind und hier zusammenfassend als ein Erkennungselement bezeichnet werden. Die beiden McrBC-Erkennungssequenzen des vorderen Elementes sind durch neun, die des hinteren Elementes durch 17 bp getrennt. Beide Elemente sind durch 47 bp separiert und durch neun (links) bzw. zehn (rechts) Basenpaare vom Ende des DNA-Moleküls distanziert. Alle vier vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen besitzen, wie bei der Sb82-DNA, die Form 5'-GM-3', und in allen vier Fällen entspricht die direkte Umgebung dieser Sequenzen der Situation, wie sie in Sb82a-10.01 gegeben ist. Dennoch reichen die genannten Unterschiede aus, um Sb99-20.02 mit 7 μ M McrB und 6 μ M McrC in Anwesenheit von 1 mM GTP bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C spalten zu können. Die dabei erzielte Ausbeute ist mit < 5 % nach 90 min Inkubationszeit jedoch ähnlich gering wie für Sb73 geschildert (vgl. S. 167). Die bei der Spaltung von Sb99-20.02 durch die McrBC-Endonuklease entstehenden Spaltprodukte sind etwa 40 bis 60 bp groß und entstehen weder bei Inkubation der DNA mit McrBC in Abwesenheit von GTP, noch bei Inkubation des unmethylierten Kontrollmoleküls Sb99-00.00 mit McrBC und GTP.

5.4.2. Sb61-11.11

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der DNA-Spaltung durch das McrBC-System ein kurzes, durch McrBC gut spaltbares Modellsubstrat gesucht. Die kurzen PCR-Produkte Sb73 (s. S. 167), Sb82 und Sb99 (s. S. 193) lieferten jedoch keine oder lediglich eine sehr geringe Ausbeute an Spaltprodukten. Daher wurde, unter Einbeziehung neuerer Daten, der Versuch unternommen, ein synthetisch herzustellendes DNA-Substrat zu entwerfen, das aufgrund seiner Eigenschaften sehr gut durch das McrBC-System spaltbar sein sollte. Das Ergebnis dieser Bemühungen ist das 61 bp lange Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11³ (zur Herstellung vgl. S. 134), das pro Einzelstrang zwei 40 bp voneinander entfernte McrBC-Erkennungssequenzen enthält. Im Doppelstrang der DNA stehen sich somit jeweils zwei

³ Bei Sb61-11.11 handelt es sich um das Oligodesoxynukleotid, das über die Grenzen des hiesigen Instituts hinaus unter der scherzhaften Bezeichnung *Wunderoligo* bekannt wurde. Der Name resultiert aus der Erwartung, mit diesem Substrat eine bis dahin nicht erreichte vollständige Durchspaltung von Oligodesoxynukleotiden durch McrBC zu erhalten.

McrBC-Erkennungssequenzen leicht versetzt gegenüber. Die Sequenz des Oligodesoxynukleotids ist dabei so gewählt, dass die McrBC-Erkennungssequenzen der Form 5'-AM-3' (M = 5-Methylcytosin) in jedem Strang einen minimalen "erlaubten" Abstand (dieser Ausdruck meint die von Sutherland *et al.* [1992] veröffentlichte Erkennungssequenz von McrBC) zueinander besitzen und in Sequenzumgebungen liegen, die zu einer guten DNA-Bindung durch McrBC führen (*MHI*, vgl. S. 135). Obwohl diese DNA, wie oben beschrieben, tatsächlich gut durch die McrB-Untereinheit der McrBC-Restriktionsendonuklease gebunden wird (vgl. Kapitel *Thermischer Einfluss auf die Proteinstabilität*, S. 120 sowie Kapitel *Gelretardationsexperimente*, S. 149), waren die Bemühungen, diese DNA durch McrBC zu spalten, nahezu erfolglos. Selbst nach Optimierungsversuchen konnten spezifische Spaltprodukte von Sb61-11.11 lediglich in Spuren nachgewiesen werden. Dagegen wird unter den gewählten Bedingungen die gleiche Menge (bezogen auf die Anzahl der McrBC-Erkennungselemente des McrBC-Restriktionssystems) an Substratplasmid pBW201 innerhalb der selben Inkubationszeit (90 min bei 37 °C) vollständig durch McrBC verdaut.

Zur Überprüfung der Qualität der synthetisch hergestellten DNA Sb61-11.11 wurden Spaltungsversuche mit geeigneten Restriktionsendonukleasen durchgeführt. So besitzt das Oligodesoxynukleotid eine zentrale Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRV* (5'-GAT↓ATC-3'; vgl. S. 134). Das Kontrollexperiment zeigt, dass die für Spaltungsexperimente mit McrBC verwendete DNA vollständig durch *EcoRV* spaltbar ist. Zur Überprüfung der Methylierung von Sb61-11.11 wurde der Versuch einer Spaltung durch das Restriktionsenzym *HpaII* durchgeführt. Die Endonuklease *HpaII* erkennt und schneidet die Sequenz 5'-C↓CGG-3', aber nicht die Sequenz 5'-MCGG-3' (mit M = 5-Methylcytosin), wie sie aus einer Methylierung der *HpaII*-Erkennungssequenz durch *M.MspI* entsteht. Da in der DNA Sb61-11.11 alle vier vorgesehenen Methylierungen in diesem Sequenzkontext liegen, sollte, sofern die Methylierungen und damit die McrBC-Erkennungssequenzen tatsächlich vorhanden sind, Sb61-11.11 nicht durch *HpaII* spaltbar sein. Tatsächlich war das verwendete Sb61-11.11 nicht durch *HpaII* spaltbar. Die Aktivität des Enzyms wurde hierbei mit dem Substrat Sb82a-00.00 überprüft, das unmethylierte 5'-CCGG-3' Sequenzen enthält (vgl. S. 138). Um ausschließen zu können, dass sonstige, durch die synthetische Herstellung der Einzelstränge und/oder deren Hybridisierung zum Doppelstrang bedingte Fehler die Ursache für das Ausbleiben der erwarteten, erfolgreichen Spaltung der Sb61-11.11 DNA durch McrBC sind, wurde die Sequenz in die einzige *EcoRI*-Schnittstelle des Plasmids pBW201 ligiert (s. S. 124) und in *E. coli* TC410 eingeschleust. Aus einer daraus angezogenen Flüssigkultur

wurde das Plasmid (pBW201W) präpariert und daraus die DNA Sb61-11.11 durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI* wieder isoliert. Das so gewonnene Sb61-11.11 ergab in McrBC-Spaltungsexperimenten das gleiche Resultat wie das aus Hybridisierung synthetischer Einzelstränge gewonnene Substrat. Aus den Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass das Unvermögen von McrBC, die DNA Sb61-11.11 effektiv zu spalten, nicht auf fehlerhafte Hybridisierung der synthetisch hergestellten Einzelstränge oder fehlende Methylierungen zurückzuführen ist. Eine Abweichung von der gewünschten Sequenz der DNA konnte durch Sequenzierung ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel *pMcrSb2 und pMcrSb3*, S. 128).

Als mögliche Ursache für den Misserfolg der Spaltung von Sb61-11.11 durch das McrBC-System wurde der geringe Abstand der Erkennungssequenzen zu den Enden der linearen DNA in Betracht gezogen (vgl. Kapitel *Diskussion*). Um die Richtigkeit dieser Annahme zu überprüfen, wurde das Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 in die einzige vorhandene *EcoRI*-Schnittstelle des Plasmids pMcrSb1 ligiert, wodurch die Plasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 entstanden (vgl. Kapitel *pMcrSb2 und pMcrSb3*, S. 128). Im Plasmid pMcrSb1 liegt die einzige Schnittstelle von *EcoRI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-G↓AATTC-3') in einem ca. 3 kbp umfassenden Abschnitt, der auch nach Methylierung des Plasmids durch *M.BsuFI* frei von Erkennungssequenzen des McrBC-Restriktionssystems ist (s. S. 128). Der Einfluss der 61 bp langen inserierten Sequenz von Sb61-11.11 in pMcrSb1 auf die Spaltung der Plasmid-DNA wurde bereits oben erläutert (vgl. Kapitel pBW201W, S. 180, und *pMcrSb2 und pMcrSb3*, S. 184). Durch Restriktionsverdau des Plasmids pMcrSb1 mit der Restriktionsendonuklease *HpaI* (erkennt und schneidet die Sequenz 5'-GTT↓AAC-3'; diese Sequenz kommt im Plasmid pMcrSb1 sowie in den daraus entstandenen Derivaten pMcrSb2 und pMcrSb3 jeweils zweimal vor) entsteht das 1022 bp lange Plasmidfragment Pf1022, das die *EcoRI*-Schnittstelle in annähernd mittiger Position enthält. Entsprechend seinem Ursprung enthält Pf1022 keine einzige Erkennungssequenz des McrBC-Restriktionssystems. Durch *HpaI*-Restriktionsverdau der pMcrSb1-Derivate pMcrSb2 und pMcrSb3 entsteht aus jedem der beiden Plasmide ein um 61 bp längeres, 1083 bp umfassendes Fragment (vgl. Plasmidkarte von pMcrSb2 in Abbildung 19, S. 187). Beide aus den Derivatplasmiden entstandenen Fragmente entsprechen Pf1022 aus pMcrSb1, enthalten aber in der *EcoRI*-Schnittstelle jeweils die Sequenz des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11. Lediglich die Orientierung dieser Sequenz ist in den 1083 bp langen Fragmenten aus pMcrSb2 und pMcrSb3 verschieden (vgl. Kapitel *pMcrSb2 und pMcrSb3*, S. 128). Da die unterschiedliche Orientierung der Sb61-11.11-Sequenz in diesen Fragmenten für die mit dieser DNA durchgeführten Versuche unerheblich ist, werden beide Fragmente zwar getrennt voneinander

untersucht, aber einheitlich als Pf1083 bezeichnet. Im Gegensatz zu Pf1022 enthalten die Pf1083-Fragmente zwei zentrale McrBC-Erkennungselemente, die aus der *in vivo* Methylierung der Sb61-Sequenz mit *M.BsuFI* resultieren.

Wie erwartet wurde das unmethylierte Fragment Pf1022 aus pMcrSb1 nicht durch das McrBC-System gespalten. Für die Pf1083-Fragmente wurden jedoch ca. 500 bp lange Spaltprodukte nach Inkubation dieser Fragmente mit McrBC erwartet, wurden aber lediglich in einer durch Ethidiumbromidfärbung kaum sichtbar werdenden Menge erhalten. Weder Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂) noch HED-Puffer (s. S. 57) mit bis zu 10 mM GTP und 1 µg · ml⁻¹ BSA befähigten 6 bis 20 µM McrB und 2 bis 7.5 µM McrC innerhalb von 90 min bei 30 °C, diese DNA effektiver zu spalten (die DNA-Spaltaktivität des McrBC-Systems ist unter diesen Bedingungen an anderen Substraten, z. B. pBW201, sehr hoch). Dieses Ergebnis wurde durch Spaltungsexperimente, bei denen das PCR-Produkt Sb173 (s. S. 146) bzw. beide Sb234-Produkte (s. S. 146) als Substrate für die McrBC-Spaltungen verwendet wurden, bestätigt. Diese *in vitro* durch *M.MspI* methylierten, primär für Bindungsstudien generierten Substratmoleküle entsprechen einem engeren Ausschnitt der *HpaI*-Fragmente Pf1022 bzw. Pf1083 mit der zentral liegenden 61-bp-Insertion (Sb234). Aus diesen Experimenten folgt, dass die extrem schlechte Spaltbarkeit des Substrates Sb61-11.11 nicht oder zumindest nicht ausschließlich auf einen zu geringen Abstand der McrBC-Erkennungselemente zu den Enden der linearen DNA zurückzuführen ist. Die Eignung der in Sb61-11.11 befindlichen McrBC-Erkennungselemente in Bezug auf ihre Organisation und den sie voneinander trennenden Abstand wird später diskutiert.

5.4.3. Sb637-00.10.01.01

Das PCR-Produkt Sb637-00.10.01.01 (kurz: Sb637) enthält die ersten vier *M.BsuFI*-Erkennungssequenzen des Plasmids pBW201, die *in vitro* durch die Methyltransferase *M.MspI* in identischer Weise wie durch *M.BsuFI* modifiziert werden, welche *in vivo* die Modifikationen an der pBW201-Sequenz durchführt (vgl. S. Abbildung 4). Nicht aus der Methylierung der vorderen, aber aus der der drei folgenden *M.MspI*-Erkennungssequenzen (5'-CCGG-3') entsteht jeweils eine McrBC-Erkennungssequenz. Diese Erkennungssequenzen sind auch in dem oben vorgestellten Plasmidfragment Pf1364 aus pBW201 die einzigen vorhandenen Methylierungsstellen (vgl. Karte der verwendeten Restriktionsfragmente aus pBW201, S. 187), weshalb Pf1364 durch die *M.BsuFI*-Methylierung die identischen McrBC-Erkennungssequenzen besitzt wie das methylierte PCR-Produkt Sb637. Die DNA Sb637 ist

jedoch deutlich kürzer als das Plasmidfragment (vgl. S. 147). Nach Inkubation der methylierten Sb637-DNA mit 4 μM McrB und 1.5 μM McrC für 90 min bei 30 °C wurden etwa 70 % der Ausgangssubstrate spezifisch durch das McrBC-Restriktionssystem gespalten. Die Größen der beiden durch die Spaltung entstandenen Produkte betragen etwa 250 bis 270 bp sowie < 400 bp (nicht näher spezifiziert). Die diesen Spaltprodukten zugeordnete Spaltstelle des McrBC-Restriktionssystems im Substrat Sb637 liegt zwischen der zweiten und der davon durch 90 bp separierten dritten McrBC-Erkennungssequenz, in der Nähe der zweiten McrBC-Sequenz. Dieses Ergebnis stimmt nicht exakt mit dem für die McrBC-Spaltung des Plasmidfragments Pf1364 erhaltenen Resultat überein, nach dem das McrBC-System die DNA-Spaltung in diesem Sequenzabschnitt in der Nähe der ersten McrBC-Erkennungssequenz durchführt, bestätigt aber die durch Spaltung des Plasmidfragments Pf810 ermittelten Befunde (vgl. S. 191). Für eine detaillierte Analyse der Spaltung des Sequenzbereiches um die in pBW201 an zweiter und dritter Position liegenden McrBC-Erkennungselemente durch das McrBC-Restriktionssystem wurde dieser DNA-Abschnitt als 157 bp langes PCR-Produkt amplifiziert (vgl. Kapitel *DNA der Sb157-Gruppe*, S. 143) und untersucht (s. nachstehendes Kapitel).

5.4.4. Sb157-DNA

Die PCR-Produkte der Sb157-Gruppe stellen Amplifikationen eines Sequenzabschnitts des Substratplasmids pBW201 dar, wobei die Sequenz von pBW201 für weitergehende Analysen zum Teil abgeändert wurde (vgl. S. 143). Es handelt sich hierbei um den Bereich der pBW201-Sequenz, der das zweite und dritte McrBC-Erkennungselement von pBW201 enthält (vgl. Plasmidkarte von pBW201 auf S. 46). Nach einer *in-vitro*-Methylierung durch die Methyltransferase *M.MspI* besitzt die DNA Sb157-01.01 die unveränderte Sequenz des amplifizierten Abschnitts von pBW201 mit einem identischen Methylierungsmuster. Eine 60minütige Inkubation bei 30 °C mit 4 μM McrB und 1 μM McrC spaltet das Substrat Sb157-01.01 zu etwa 40 %, während die unmethylierte Kontroll-DNA mit gleicher Sequenz nicht durch das McrBC-System gespalten wird. Die Sequenz des amplifizierten Abschnitts von pBW201 wurde durch Verwendung abgeänderter *primer*-Sequenzen bei der Generierung der Substrat-DNA so verändert, dass die *in-vitro*-Methylierung der PCR-Produkte mit *M.MspI* ein verändertes Muster an McrBC-Erkennungssequenzen ergibt. Bei den Sequenzänderungen wurde jedoch die Anzahl der vorhandenen Erkennungssequenzen der *M.MspI*-Methyltransferase beibehalten, so dass bei der *in-vitro*-Methylierung stets die gleiche

Anzahl von vier Methylgruppen in die Substrate eingebaut wurde. Das so erzeugte Substratmolekül Sb157-00.00, welches trotz der vier vorhandenen Methylgruppen keine McrBC-Erkennungssequenz besitzt (vgl. S. 144), erwies sich als nicht spaltbar durch das McrBC-Restriktionssystem. Im Unterschied dazu zeigten sich die Substrate Sb157-10.01 und Sb157-10.10, die beide wie die oben erwähnte DNA Sb157-01.01 zwei McrBC-Erkennungssequenzen besitzen, die aber in jeweils anderer Orientierung zueinander stehen, als vergleichbar gut durch die Restriktionsendonuklease McrBC spaltbar wie das Substrat Sb157-01.01. In der DNA Sb157-01.01 liegen beide McrBC-Erkennungssequenzen auf dem gleichen DNA-Strang (dem unteren) und sind somit *in cis* orientiert (vgl. S. 144). Dies ist auch im Molekül Sb157-10.10 der Fall, allerdings liegen hier beide McrBC-Erkennungssequenzen im oberen DNA-Strang (vgl. S. 145). In dem dritten Substrat mit zwei 5'-RM-3'-Sequenzen, Sb157-10.01, sind beide McrBC-Erkennungssequenzen *in trans* orientiert, d. h. sie liegen gegenläufig ausgerichtet verteilt in beiden DNA-Strängen. Diese Unterschiede in der Orientierung der McrBC-Erkennungssequenzen in der Substrat-DNA spielen bezüglich der Quantität der Spaltbarkeit dieser Substrate durch das McrBC-Restriktionssystem keine Rolle. Qualitativ zeigen sich jedoch geringfügige Unterschiede, die die Position der von der McrBC-Restriktionsendonuklease verwendeten Spaltstellen betreffen. Hier kommt es teilweise zu Verschiebungen der von McrBC präferierten Spaltpositionen innerhalb des sequenzgleichen Abschnitts zwischen den McrBC-Erkennungssequenzen um ein bis mehrere Basenpaare, was mit Hilfe von radioaktiver Einzelstrangmarkierung der verwendeten Substrate und einer sich an die McrBC-Spaltreaktion anschließenden Analyse der durch die Spaltungen entstandenen Produktgrößen durch denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese gezeigt werden konnte. Abbildung 20 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Analyse für die Spaltung von Sb157-01.01 durch McrBC, wobei die durch das McrBC-System verwendeten Spaltstellen in der DNA-Sequenz in Abbildung 21 gezeigt werden.

Wie aus dem Autoradiogramm der Abbildung 20 hervorgeht, spaltet die Restriktionsendonuklease McrBC die Substrat-DNA nur zwischen den beiden *in cis* orientierten Erkennungssequenzen. Dabei verwendet der Enzymkomplex nicht nur eine singuläre Spaltposition, spaltet also nicht in einem definierten Abstand von einer Erkennungssequenz entfernt. Vielmehr wird die Substrat-DNA an multiplen Stellen durch McrBC gespalten, wobei die am häufigsten verwendeten Spaltpositionen nicht mittig zwischen beiden Erkennungssequenzen liegen.

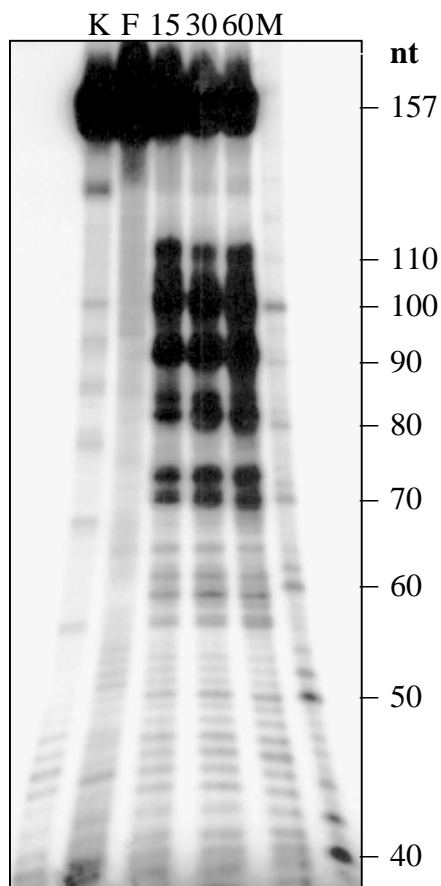


Abbildung 20: Spaltung von Sb157-01.01 durch McrBC.

Die als nebenstehendes Autoradiogramm dokumentierte Spaltung von Sb157-01.01, das am 5'-Ende des unteren Stranges eine radioaktive Markierung (^{32}P) besitzt, mit 4 μM McrB und 1 μM McrC wurde mit einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (6 % PAA) elektrophoretisch analysiert. Aufgetragen wurde die denaturierte freie DNA Sb157-01.01 (157 bp, Gelbahn *F*), verschiedene Zeitwerte der Inkubation des Spaltansatzes bei 30 °C in Anwesenheit von 2 mM GTP (Gelbahnen *15*, *30* bzw. *60*; die Zahlen bezeichnen die Inkubationszeit in Minuten) bzw. in Abwesenheit von GTP (nach 60 min Inkubation; Gelbahn *K*) sowie ein Größenstandard (10 bp DNA-Leiter; Gelbahn *M*), der die Lage von definierten, zum Teil am rechten Bildrand bezeichneten DNA-Längen im Gel anzeigt.

Fast alle Stellen, an denen der radioaktiv markierte DNA-Strang des Substrats Sb157-01.01 durch das McrBC-System gespalten wurde, liegen deutlich in Richtung der einen der beiden im Substrat vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen, und zwar in 3'-Richtung des die Erkennungssequenzen tragenden DNA-Stranges (vgl. auch Abbildung 21). Auffällig ist das Muster der durch das McrBC-System verwendeten Spaltpositionen: Die am häufigsten benutzten Spaltstellen sind durch 10 bis 11 bp voneinander getrennt, wobei in 5'-, als auch in 3'-Richtung von diesen Maxima jeweils mit zunehmendem Abstand immer weniger häufig verwendete Spaltpositionen liegen. Die periodische Wiederholung von maximaler Spaltaktivität alle 10 bis 11 bp entlang des DNA-Stranges wurde auch bei den DNA-Substraten Sb157-10.01 und Sb157-10.10 beobachtet. Bei diesen Substraten ist die DNA-Sequenz in den Bereichen identisch, in denen die DNA-Spaltung erfolgt. Dennoch liegen die in den einzelnen verwendeten Substraten am häufigsten verwendeten Spaltpositionen, wie oben erwähnt, nicht an identischen Stellen innerhalb dieser Sequenz, sondern sind teilweise um ein, selten bis mehrere Basenpaare gegeneinander verschoben. Dies bedeutet, dass die Position der DNA-Spaltung nur sehr bedingt von dem unmittelbaren Sequenzkontext

beeinflusst wird (vgl. auch Abbildung 21). Der Grad der Verschiebung ist jedoch nicht für alle Schnittstellen einheitlich, so dass es zu leichten Unterschieden im Abstandsraaster der maximal verwendeten Schnittpositionen kommt.

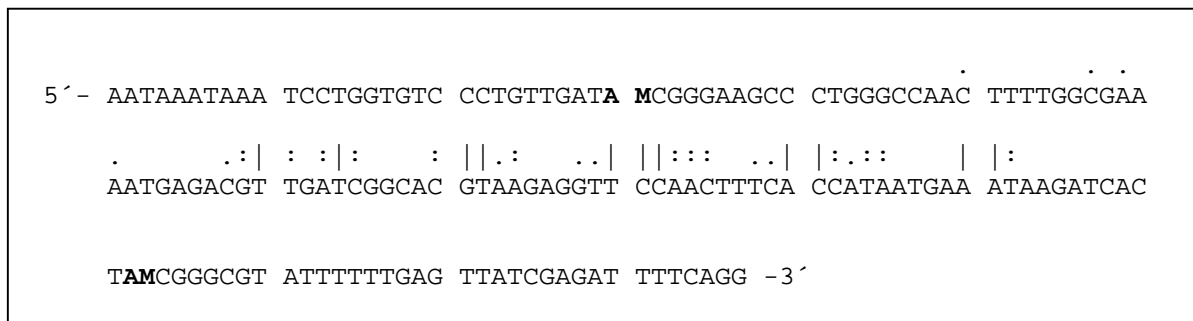


Abbildung 21: Schnittpositionen des McrBC-Systems im unteren DNA-Strang von Sb157-01.01.

Gezeigt ist die DNA-Sequenz des unteren Stranges vom Substrat Sb157-01.01 (vgl. S. 144), dessen Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem in Abbildung 20 gezeigt ist. 3´ zu den in der Abbildung markierten Basen wurde der DNA-Strang durch McrBC häufig gespalten. Die Häufigkeit der Verwendung der markierten Spaltposition durch McrBC nimmt in der Reihenfolge *Punkt*, *Doppelpunkt*, *Strich* zu. Durch Fettdruck hervorgehoben sind die beiden Erkennungssequenzen des McrBC-Restriktionssystems in dem Substrat.

In den DNA-Substraten Sb157-01.01 und Sb157-10.10 sind beide McrBC-Erkennungssequenzen jeweils in einem DNA-Strang lokalisiert und besitzen in beiden Fällen eine identische Separation durch 90 bp. Dadurch, dass sich die *in cis* orientierten McrBC-Erkennungssequenzen in beiden Substraten im jeweils anderen DNA-Strang befinden, sind sie in beiden Substratmolekülen in ihrer Position um 4 bp verschoben. Bei einer völligen Unabhängigkeit der bevorzugten Spaltpositionen der McrBC-Restriktionsendonuklease von der sich zwischen den McrBC-Erkennungssequenzen befindlichen DNA-Sequenz sollten diese Positionen in beiden Substraten um ebenfalls diesen Betrag von 4 bp verschoben sein. Dies ist, wie oben geschildert, jedoch nicht der Fall. Somit besitzen die Lokalisationen der McrBC-Erkennungssequenzen selbst keinen allein definierenden Einfluss auf die Positionen der durch das McrBC-System bevorzugten Spaltstellen im DNA-Substrat.

Der Vergleich der bevorzugten Schnittpositionen im oberen und unteren DNA-Strang der Substrate Sb157-10.01 bzw. Sb157-10.10 durch Analyse der sich aus McrBC-Spaltungen ergebenden Fragmentierungsmuster der radioaktiv markierten Einzelstränge sollte klären, ob die McrBC-Restriktionsendonuklease bei der Spaltung eines DNA-Doppelstranges ein

einheitliches Schnittmuster anwendet. Die Mehrzahl der bekannten Restriktionsenzyme schneidet die beiden einzelnen DNA-Stränge des doppelsträngigen Substratmoleküls in einem definierten Abstand zueinander. Dies geschieht oft innerhalb der Erkennungssequenz, wie bei den meisten Typ II Restriktionsendonukleasen, oder in einer nicht definierten Sequenzumgebung, wie beispielsweise bei dem zu den Typ IIs R/M-System gehörenden Restriktionsenzym *Esp3I*, das den oberen DNA-Strang unabhängig von der lokalen Sequenz immer ein Nukleotid, den unteren DNA-Strang immer fünf Nukleotide hinter (in 3'-Richtung zu) der nichtpalindromen Erkennungssequenz 5'-CGTCTC-3' spaltet (Bitinaite *et al.*, 1991). Für die McrBC-Restriktionsendonuklease zeigte sich jedoch, dass die Positionen der im oberen DNA-Strang durchgeführten Spaltungen in keinem definierten Abstandsverhältnis zu den im unteren DNA-Strang lokalisierten Spaltungspositionen stehen (vgl. Abbildung 22). Im Substrat Sb157-10.10 liegen die vom McrBC-System hauptsächlich im oberen und unteren DNA-Strang verwendeten Spaltpositionen um vier, zum Teil aber auch um drei, fünf oder sechs Basenpaare gegeneinander versetzt (in der Gegenrichtung 6 bis 7 bp), während im Substrat Sb157-10.01 fünf oder acht Basenpaare (in Gegenrichtung 3, 4 oder 5 bp) zwischen den hauptsächlich im oberen und unteren DNA-Strang liegenden Spaltpositionen des McrBC-Systems liegen.

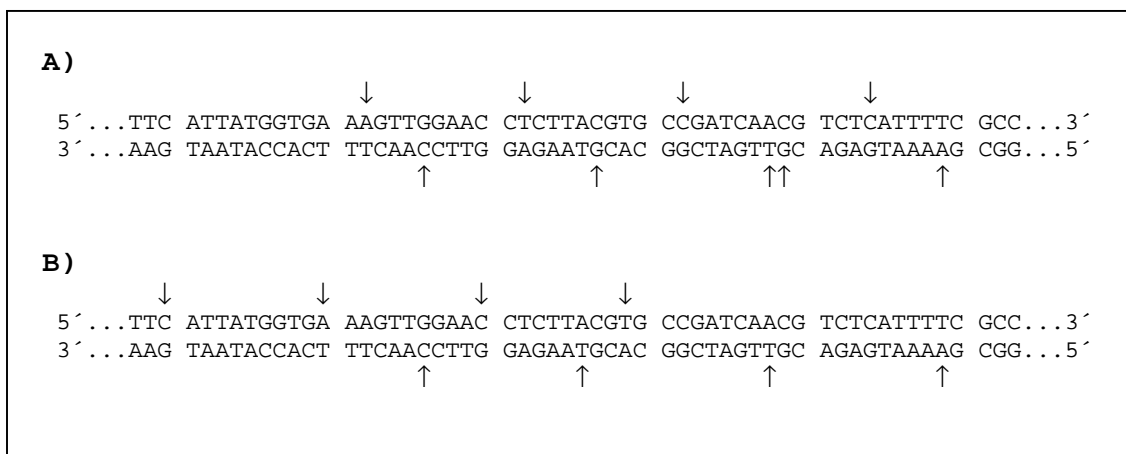


Abbildung 22: Schnittpositionen des McrBC-Systems im Doppelstrang von Sb157-DNA.

Die Abbildungen zeigen jeweils die Sequenz des DNA-Doppelstrangs der Sb157-DNA von Pos. 48 (erste Base) bis Pos. 113 (letzte Base; die vollständige Sequenz von Sb157 ist im Kapitel *DNA der Sb157-Gruppe* [vgl. S. 143] gezeigt). Die Pfeile markieren Nukleotide, 3' zu welchen der jeweilige Strang von Sb157-10.10 (Abbildung A) bzw. von Sb157-10.01 (Abbildung B) durch das McrBC-System am häufigsten gespalten wurde.

Ein auffälliges Merkmal der durch die McrBC-Spaltungen erhaltenen Spaltungsmuster der Sb157-Substrate ist die periodische Wiederholung maximaler McrBC-Spaltaktivität am DNA-Substrat in Abständen von jeweils 10 bis 11 bp entlang der Einzelstränge, die, wie oben beschrieben, weitgehend unabhängig von der jeweils vorliegenden Basensequenz ist. Ein solches regelmäßiges Spaltmuster wurde in dieser Arbeit auch bei Verwendung eines anderen DNA-Substrats (Sb128-10.01) beobachtet (vgl. S. 205).

5.4.4.a. Generierung einer Translokationsbarriere

Die Restriktionsendonuklease McrBC ist ein Proteinsystem, das nach den in dieser Arbeit gezeigten Daten über relativ große Distanzen hinweg mit zwei systemspezifischen Erkennungssequenzen interagieren kann. Die Funktion der dafür notwendigen Hydrolyse des Kofaktors GTP ist in diesem Zusammenhang nicht bekannt. Auch wenn sich GTP-hydrolysierende Enzyme, wie z. B. die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligten G-Proteine, oftmals selbst durch die Hydrolyse des Kofaktors in ihrer Aktivität regulieren, so kann für das McrBC-System nicht ausgeschlossen werden, dass die bei der Hydrolyse von GTP freiwerdende Energie für aktive Bewegungen des Enzymkomplexes verwendet wird. Auch andere Restriktionssysteme nutzen die Nukleosidtriphosphathydrolyse für derartige Bewegungen, wie beispielsweise die ATP-abhängigen Typ I Restriktionsendonukleasen, die durch die Hydrolyse von ATP DNA translozieren können (vgl. *Einleitung*). Ein derartiger Mechanismus kann auch für McrBC vermutet werden. Möglicherweise gibt es sogar noch eine weiterreichende Gemeinsamkeit zwischen McrBC und Typ I Restriktionsenzymen, da auch diese in der Regel zwei weit voneinander entfernte Erkennungssequenzen in linearen DNA-Molekülen benötigen, um die DNA spalten zu können. Zwei sich durch gegenläufige DNA-Translokation aufeinander zubewegende Enzymkomplexe sollten nach dem etablierten Modell (Studier & Bandyopadhyay, 1988) miteinander interagieren, um die Spaltreaktion an der DNA auslösen zu können. Später zeigte sich jedoch durch Verwendung sog. Translokationsbarrieren, dass es nicht unbedingt die spezifische Interaktion mit einem zweiten Typ I Enzymkomplex ist, die die DNA-Spaltung auslöst, sondern die Hinderung eines einzelnen Enzymkomplexes an der Fortführung der DNA-Translokation. Basierend auf Ähnlichkeiten zwischen McrBC und den Typ I Restriktionsenzymen bestand die Überlegung, ob eine derartige Translokationsbarriere auch die Restriktionsendonuklease McrBC dazu veranlassen könnte, ein lineares DNA-Substrat mit nur einer einzigen McrBC-Erkennungssequenz zu spalten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch

unternommen, Sb157-Derivate mit singulärer McrBC-Erkennungssequenz durch Generierung einer Translokationsbarriere mit der McrBC-Endonuklease zu spalten.

Zu diesem Zweck wurden zwei Abkömmlinge der Sb157-DNA generiert, die jeweils eine einzelne Erkennungssequenz des McrBC-Systems und, in unterschiedlicher Distanz dazu, eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRV* besitzen. Letzteres hat den Hintergrund, dass die Variante D90A des *EcoRV*-Restriktionsenzym katalytisch vollständig inaktiv ist und somit selbst keine DNA-Spaltreaktion verursacht, aber eine sehr hohe Affinität zu seiner Erkennungssequenz (5'-GATATC-3') besitzt (Thielking *et al.*, 1992). Die spezifische Bindung der D90A-Variante von *EcoRV* an seine in der Substrat-DNA vorhandene Erkennungssequenz könnte als Barriere eine eventuelle Translokation der Substrat-DNA durch einen an die McrBC-Erkennungssequenz gebundenen McrBC-Enzymkomplex verhindern. Die hierfür verwendeten Substrate sind Sb157-01.Eco und Sb157-10.Eco, die die McrBC-Erkennungssequenz in verschiedener Orientierung, durch 89 bp bzw. durch 93 bp von der *EcoRV*-Erkennungssequenz separiert, enthalten (vgl. S. 145 und S. 145).

Die spezifische Bindung durch *EcoRV*-D90A an die Substrate wurde vor der Durchführung des eigentlichen Spaltungsexperiments mit McrBC durch Gelretardationsexperimente überprüft. Unter Milieubedingungen, die auch im McrBC-Spaltungsansatz verwendet wurden (HMD-Puffer mit insgesamt 15 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin sowie 1 µg·µl⁻¹ BSA) wurde gezeigt, dass 250 nM *EcoRV*-D90A sowohl 2 nM Sb157-01.Eco als auch 2 nM Sb157-10.Eco nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zu fast 100 % spezifisch binden. Für die eigentlichen McrBC-Spaltexperimente wurden Bindungsansätze oben genannter Zusammensetzung mit DNA und *EcoRV*-D90A nach Vorinkubation wie oben jeweils mit einem gleichen Volumen vereinigt, das identische Konzentrationen aller Komponenten enthielt, aber zusätzlich 4 µM McrB, 1 µM McrC und 2.5 mM GTP. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass eine evtl. nur unter bestimmten Vorinkubationsbedingungen (Reihenfolge der Bindung von *EcoRV* bzw. McrBC an die Substrat-DNA) zu erzielende Spaltaktivität auf jeden Fall detektiert wird. Der vereinigte Reaktionsansatz (mit 2 nM DNA, 2 µM McrB, 0.5 µM McrC, 1.25 mM GTP, 250 nM *EcoRV*-D90A) wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert und mit Hilfe eines denaturierenden Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilms, der die Position der radioaktiv markierten DNA dokumentiert. Während die Kontroll-DNA Sb157-01.01 (mit zwei McrBC-Erkennungssequenzen) unter den genannte Bedingungen ein durch das McrBC-System spaltbares Substrat ist, konnten für beide *EcoRV*-gebundenen

Substrate (Sb157-01.Eco, Sb157-10.Eco) keine McrBC-Spaltprodukte nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass *EcoRV-D90A* an diesen Substraten keine Wirkung als Translokationsbarriere entfaltet und somit keine spezifische Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem in einem nennenswerten Ausmaß bewirkt. Nur ein *positives* Ergebnis, d. h. der Nachweis spezifisch durch die Anwesenheit einer Translokationsbarriere ausgelöster Spaltungsereignisse durch McrBC, hätte einen sehr eindeutigen Rückschluss auf die Funktionsweise des McrBC-Enzymkomplexes zugelassen. Ein *negatives* Resultat, also das *Ausbleiben* der Reaktion in diesem Experiment muss aber nicht bedeuten, dass das McrBC-System keine DNA-Translokation durchführt oder nicht möglicherweise mit anderen Substraten oder anderen Translokationsbarrieren eine solche Reaktion hervorgerufen werden kann.

5.4.5. Sb128-DNA

Die Wechselwirkung der Untereinheiten der Restriktionsendonuklease McrBC mit DNA-Molekülen der Sb128-Gruppe (vgl. S. 141) wurde in dieser Arbeit hinsichtlich der DNA-Bindungseigenschaften des McrBC-Restriktionssystems eingehend untersucht und im Kapitel *Untersuchungen zur DNA-Bindung* (S. 148 ff.) beschrieben. An dieser Stelle soll die Spaltung dieser Substrate durch die McrBC-Endonuklease vorgestellt werden. Analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit DNA der Sb157-Gruppe konnte auch für diese DNA-Substrate keine Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem erzielt werden, wenn die DNA entweder unmethyliert vorlag (Sb128-00.00) oder nur eine McrBC-Erkennungssequenz besaß (Sb128-00.01, Sb128-10.00). Wie zuvor benötigt auch hier die Endonuklease McrBC das Vorliegen von zwei getrennten Erkennungssequenzen im linearen Substrat. Im Falle der durch McrBC spaltbaren, 128 bp langen DNA Sb128-10.01 liegen die beiden Erkennungssequenzen gegenläufig orientiert (*in trans*, also auf verschiedenen DNA-Strängen) und sind durch 66 bp separiert.

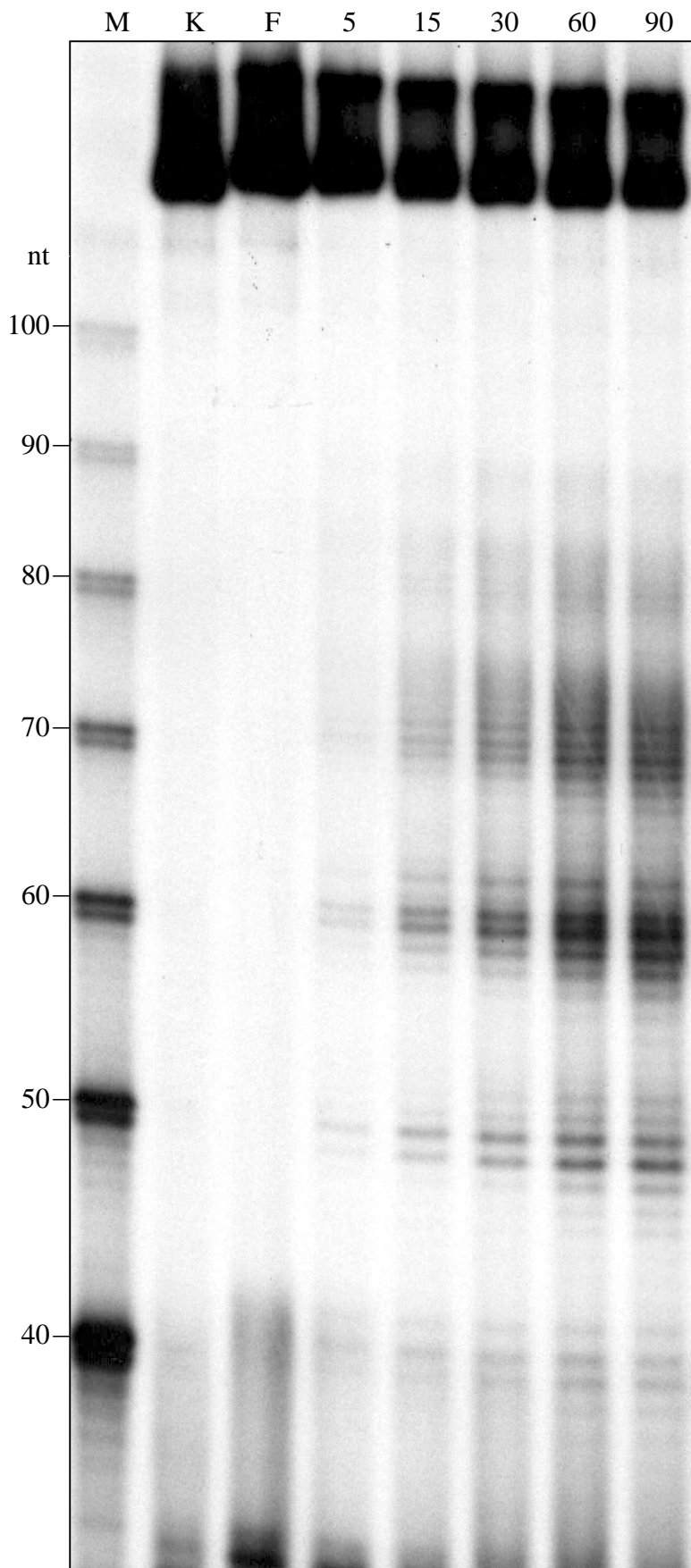


Abbildung 23: Spaltung von Sb128-10.01 durch McrBC.

Die als nebenstehendes Autoradiogramm dokumentierte Spaltung von Sb128-10.01, das am 5'-Ende des unteren Stranges eine radioaktive Markierung (^{32}P) besitzt, mit $4\ \mu\text{M}$ McrB und $1\ \mu\text{M}$ McrC wurde mit einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (6 % PAA) elektrophoretisch analysiert. Aufgetragen wurden die denaturierte freie DNA Sb128-10.01 (128 bp, Gelbahn *F*), verschiedene Zeitwerte der Inkubation des Spaltansatzes bei $30\ ^\circ\text{C}$ in Anwesenheit von $1\ \text{mM}$ GTP (Gelbahnen *5*, *15*, *30*, *60*, bzw. *90*; die Zahlen bezeichnen die Inkubationszeit in Minuten) bzw. in Abwesenheit von GTP (nach 90 min Inkubation; Gelbahn *K*) sowie ein Größenstandard (10 bp DNA-Leiter; Gelbahn *M*), der die Lage von definierten, zum Teil am linken Bildrand bezeichneten DNA-Längen im Gel anzeigt.

Die Spaltung von Sb128-10.01 durch das McrBC-System wurde durch radioaktive Markierung des 5'-Endes des unteren Einzelstranges der DNA und Auswertung der durch eine Kinetik erhaltenen Spaltungsergebnisse mit denaturierender Polyacrylamidgелеlektrophorese analysiert. Ein aus dieser Untersuchung resultierendes Autoradiogramm des Elektrophorese-Gels ist in Abbildung 23 gezeigt. Auffällig ist das bei der Spaltung dieses Substrates durch McrBC entstehende Fragmentierungsmuster, das ähnlich wie bei den Sb157-Substraten keine einheitlichen Spaltprodukte zeigt. Vielmehr resultieren auch aus der Spaltung dieses Substrats Hauptprodukte, die sich periodisch um 10 bis 11 bp in ihrer Länge unterscheiden. Unmittelbar benachbart zu den Spaltpositionen in dem Substrat, deren Verwendung zu diesen Hauptprodukten führt, liegen weitere Spaltstellen, die von der McrBC-Restriktionsendonuklease mit zunehmendem Abstand sowohl in 5'-Richtung als auch in 3'-Richtung weniger stark verwendet werden. Auf diese Weise entsteht, wie durch die McrBC-Spaltung der Sb157-Substrate, eine Verteilung der Produktlängen mit periodisch um 10 bis 11 bp voneinander entfernten lokalen Maxima, wobei in einem Abstand von ca. 30 bis 40 bp von den McrBC-Erkennungssequenzen, also in diesem Fall etwa in der Mitte der Substrat-DNA, die absolut höchste Spaltaktivität zu verzeichnen ist.

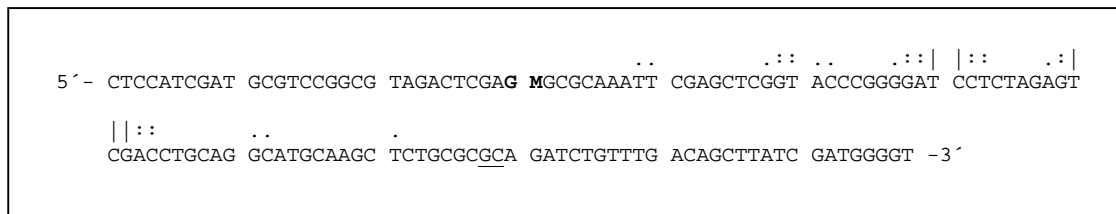


Abbildung 24: Schnittpositionen des McrBC-Systems im unteren DNA-Strang von Sb128-10.01.

Gezeigt ist die DNA-Sequenz des unteren Stranges vom Substrat Sb128-10.01 (vgl. S. 143), dessen Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem in Abbildung 23 gezeigt ist. 3' zu den in der Abbildung markierten Basen wurde der DNA-Strang durch McrBC häufig gespalten, wobei die bestehenden Quantitätsunterschiede durch entsprechende Symbolik in der Abbildung kenntlich gemacht wurden (die Häufigkeit der Verwendung der markierten Spaltposition durch McrBC nimmt in der Reihenfolge *Punkt*, *Doppelpunkt*, *Strich* zu). Durch Fettdruck hervorgehoben ist die sich im dargestellten Strang befindliche Erkennungssequenz des McrBC-Restriktionssystems. Die Position, an der sich die zweite Erkennungssequenz im Gegenstrang befindetet, ist durch einen Unterstrich markiert.

Die Zuordnung der stark oder weniger stark durch McrBC frequentierten Spaltpositionen in dem unteren Strang des Substrats Sb128-10.01 zu der in diesem Strang vorliegenden

Basensequenz (Abbildung 24) läßt auch in diesem Fall keine Abhängigkeit der durch das McrBC-System verwendeten Spaltstellen von der lokalen Sequenzumgebung erkennen. Dass die Verteilung der Spaltstellen in dem gezeigten Strang der Sb128-10.01-DNA anders als in den Sb157-Substraten relativ symmetrisch ist, dürfte auf den kürzeren Abstand der beiden im Substrat vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen zurückzuführen sein (hier 66 statt 91 bp in Sb157-DNA).

5.5. *In-trans*-Aktivierung

Restriktionssysteme erkennen eine mehr oder minder definierte Basensequenz in DNA-Molekülen und spalten beim Vorfinden solcher Erkennungssequenzen das DNA-Molekül an einer typabhängigen Stelle innerhalb oder außerhalb der Erkennungssequenz hydrolytisch. Die überwiegende Mehrzahl der bekannten Restriktionsenzyme benötigt als Auslöser der spezifischen Spaltreaktion lediglich das Vorliegen einer einzigen Erkennungssequenz (z. B. Typ II Restriktionsenzyme, vgl. S. 7), andere benötigen zwei solcher Sequenzen, die in dem gleichen DNA-Molekül liegen müssen (z. B. Typ III Restriktionsenzyme, vgl. S. 10) oder auch auf zwei getrennten Molekülen lokalisiert sein können. Die Aktivierung der DNA-Spaltung nach Bindung der Erkennungssequenz an eine Bindungsstelle des Restriktionsenzym durch Bindung einer zweiten solchen Sequenz (*Effektor*) an eine zweite im Molekülkomplex vorhandene Bindungsstelle ist beispielsweise für Typ IIe Restriktionsenzyme typisch (vgl. S. 8). Da das McrBC-Restriktionssystem, das aufgrund seiner besonderen Eigenschaften nicht in eine der großen Typengruppen von Restriktionsenzymen passt, auf linearer DNA mindestens zwei Erkennungssequenzen benötigt, um die DNA spalten zu können, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit einer allosterischen Aktivierung der Spaltaktivität des Enzymkomplexes durch solche Effektor-Sequenzen überprüft.

Als Substrate für die Spaltreaktion der McrBC-Endonuklease wurden dafür zwei Arten von DNA-Molekülen ausgewählt, die bei alleiniger Anwesenheit nur in sehr geringem Ausmaß durch McrBC gespalten werden. Es handelt sich dabei um das oben vorgestellte Plasmidfragment Pf430 (vgl. S. 189) und das synthetische Oligodesoxynukleotid Sb61-11.11 (vgl. S. 194). Es wurde getestet, ob ein selbst sehr gut durch McrBC spaltbares Plasmid (pBW201, s. S. 169) auch als Effektor für die Spaltung dieser DNA-Substrate zu wirken vermag. Als Negativ-Kontrolle diente ein Plasmid, das keine McrBC-Erkennungssequenzen enthält (pBN211, vgl. S. 41). Es wurden 20 ng radioaktiv markiertes Pf430 bzw. 0.4 μ M ebenfalls radioaktiv markiertes Sb61-11.11 mit bis zu 9 μ M McrB und bis zu 3.5 μ M McrC

unter Zugabe unspezifischer Plasmid-DNA (bis 200 ng pBN211) oder Zugabe spezifischer Plasmid-DNA (bis 200 ng pBW201) eine Stunde bei 28 °C inkubiert. Das Substratplasmid pBW201 wird unter diesen Bedingungen fast vollständig durch McrBC gespalten. Bezogen auf die im 25- μ l-Reaktionsansatz vorhandenen McrBC-Erkennungselemente bedeutet die Zugabe von 200 ng pBW201 zu 20 ng Pf430 eine Erhöhung der Konzentration der Erkennungselemente auf das etwa 10-fache, die Zugabe der gleichen Menge pBW201 zu 0.4 μ M Sb61-11.11 eine Erhöhung um etwa 10 %. In beiden Fällen war kein meßbarer Effekt auf die Effizienz der Spaltung der kurzen DNA durch das McrBC-System zu beobachten. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass sich die McrBC-Restriktionsendonuklease McrBC nicht *in trans* aktivieren läßt, sondern dass beide McrBC-Erkennungselemente auf dem selben DNA-Molekül liegen müssen. Auf eine weitergehende, in engeren Konzentrationsstufen erfolgende Titration der Substrate gegen die Enzymkonzentration wurde daher verzichtet.

IV. DISKUSSION

Die Restriktionsaktivität der komplexen, GTP-abhängigen Endonuklease McrBC aus *Escherichia coli* K-12 ist schon seit 1952 bekannt. Seit dieser Zeit werden sowohl die Restriktionsendonuklease als auch Themen, die direkt und indirekt mit ihr zusammenhängen, in einer ganzen Reihe von Laboratorien erforscht. Dennoch ist der Wissensstand über McrBC, verglichen mit den Kenntnissen über andere Restriktionsenzyme (z. B. über die ebenfalls in *E. coli* lokalisierten Typ II Restriktionsenzyme *EcoRI* und *EcoRV*), relativ bescheiden, was Ausdruck der Komplexität der McrBC-Restriktionsendonuklease und deren besonderer Anforderungen an das DNA-Substrat ist. Vor allem in jüngerer Zeit wurden jedoch vermehrt detailliertere Erkenntnisse über dieses System gewonnen, die als Grundlage für die nachstehende Diskussion der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate dienen sollen. In dieser Arbeit wurden *in-vitro*-Experimente zur Charakterisierung der Restriktionsendonuklease McrBC durchgeführt, die sich schwerpunktmäßig mit der DNA-Interaktion des Systems, aber auch mit bestimmten Eigenschaften der Untereinheiten selbst befassen. Für diese Untersuchungen mussten zunächst die Untereinheiten des Restriktionssystems aufgereinigt und entsprechende DNA-Substrate hergestellt werden. Der Erfolg dieser Bemühungen ist in dem voranstehenden Ergebnisteil dieser Arbeit dokumentiert (s. Kapitel *Proteinaufreinigungen*, S. 114, sowie Kapitel *Herstellung der DNA-Substrate*, S. 123). Die mit diesen aufgereinigten Komponenten durchgeführten Experimente galten Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Untereinheiten des McrBC-Restriktionssystems, Analysen der DNA-Wechselwirkung des Systems und der aus diesen Wechselwirkungen zum Teil resultierenden Auslösung einer DNA-Spaltungsreaktion. Zudem wurden eingehende Untersuchungen zum Phänomen der DNA-Spaltung durch McrBC an sich durchgeführt. Aus zahlreichen experimentellen Untersuchungen zu diesen Themen wurde eine Vielzahl an Ergebnissen gewonnen, die obenstehend beschrieben wurde (s. Kapitel *Thermischer Einfluss auf die Proteinstabilität*, S. 120, Kapitel *Untersuchungen zur DNA-Bindung*, S. 148 sowie Kapitel *Untersuchungen zur DNA-Spaltung*, S. 166) und – wie Puzzlesteine zu einem Gesamtbild – zu einer Vorstellung über die Funktionsweise der McrBC-Restriktionsendonuklease beitragen. Dies soll im Folgenden erörtert werden.

An dieser Stelle sei daran erinnert, dass McrBC in *E. coli* zwar einen Restriktions-Phänotyp hervorbringt, aber neben Eigenschaften, die für Restriktionsendonukleasen typisch sind, auch

andere Merkmale besitzt, die bei nur wenigen Restriktionssystemen vorkommen, für Restriktionsenzyme ungewöhnlich sind oder unter allen bekannten Restriktionsenzymen nur bei McrBC zu finden sind. Derartige besondere Eigenschaften von McrBC sind der komplexe Aufbau des Systems aus mehreren verschiedenen Untereinheiten, die Fähigkeit zur intrinsischen Hydrolyse von GTP, die strikte Abhängigkeit der Restriktionsaktivität von der GTP-Hydrolyse, die Spaltung ausschließlich spezifisch methylierter DNA, die Abhängigkeit der DNA-Spaltung vom Vorhandensein mindestens zweier Erkennungssequenzen in linearen DNA-Substraten, die zudem noch einen gewissen Abstand zueinander haben müssen, aber in beliebiger Orientierung zueinander stehen können, die verglichen mit anderen Restriktionsenzymen niedrige Umsatzgeschwindigkeit bei der DNA-Spaltung sowie weitere Eigenschaften, die durch die vorliegende Arbeit näher beschrieben werden können und nachfolgend diskutiert werden. Durch die Kombination dieser Eigenschaften ist McrBC im Reich der Restriktionsenzyme eine singuläre Erscheinung. Viele Details der Eigenschaften des Proteinsystems selbst, aber auch der diesem zugrunde liegenden genetischen Organisation deuten darauf hin, dass das McrBC-System seinen Ursprung nicht in *E. coli* hat und möglicherweise aus funktionell abweichenden Vorläufern gebildet wurde. Bei der nachfolgenden Diskussion der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wird diese Vermutung nicht außer Acht gelassen, sondern besonders diskutiert, da die phylogenetische Entwicklung eines Restriktionssystems solcher Komplexität ebenso interessant ist wie dessen Funktionsweise.

1. Untereinheiten und Domänen des McrBC-Systems

Die Restriktionsendonuklease McrBC ist ein komplexes System, das durch verschiedene Untereinheiten gebildet wird. Diese Untereinheiten werden durch zwei Gene codiert, die in einem Operon in der *immigration control region* des *E.-coli*-Genoms lokalisiert sind. Aus beiden Genen (*mcrB*, *mcrC*) gehen insgesamt drei Genprodukte hervor (McrB, McrB_s, McrC), wobei eines dieser Produkte (McrB_s) aus einem *in frame* liegenden Translationsstart eines der Gene (*mcrB*) gebildet wird und somit einem Fragment des vollständigen Genprodukts (McrB) gleicht. Interessanterweise ist das kleinere Produkt McrB_s für die Restriktionsfunktion des Systems entbehrlich, wird aber *in vivo* dennoch in gleicher Quantität wie das vollständige Produkt McrB gebildet. Bei einem optimalen Konzentrationsverhältnis von McrB zu McrC inhibiert die zusätzliche Anwesenheit von McrB_s die Restriktionsaktivität des Komplexes, während bei einer relativ zur vorhandenen McrC-Konzentration suboptimalen McrB-

Konzentration die Anwesenheit einer bestimmten Konzentration an McrB_s die Restriktion von DNA durch die McrBC-Endonuklease aktiviert. Wegen dieser Eigenschaft wurde dem McrB_s-Protein eine die McrBC-Restriktionsaktivität in *E. coli* K-12 modulierende Funktion zugeschrieben (Beary *et al.*, 1997; Panne *et al.*, 1998). Tatsächlich ist auch von anderen Proteinen bekannt, dass die Funktion eines Proteins voller Länge durch ein Fragment dieses Moleküls reguliert werden kann. So wird z. B. die Tn5-Transpositionsaktivität der Transposase Tnp durch die Tnp-Variante Inh inhibiert, der die ersten 55 Aminosäuren von Tnp fehlen (de la Cruz *et al.*, 1993). Auch wenn nicht von der Hand zu weisen ist, dass McrB_s tatsächlich einen Einfluss auf die Restriktionsaktivität des McrBC-Systems hat, so ist es doch fraglich ob dieser Mechanismus *in vivo* tatsächlich zur Regulation der McrBC-Aktivität verwendet wird. Dagegen spricht das oben erwähnte konstante Verhältnis zwischen McrB- und McrB_s-Expression. Da sich außerdem, wie aus den Daten von Panne *et al.* (1998) hervorgeht, die Zugabe von McrB_s in Bezug auf die Restriktionsaktivität des McrBC-Komplexes ebenso auswirkt wie eine entsprechende Zugabe von McrB, aber umgekehrt McrB_s nicht McrB in einem DNA-spaltaktiven Komplex komplett ersetzen kann, ließe sich, um den gleichen Effekt zu erhalten, die zusätzliche Expression von McrB_s *in vivo* durch eine Erhöhung der McrB-Expressionsrate oder auch alternativ durch eine reduzierte Expression von McrC ersetzen. Möglicherweise ist die Restriktionsaktivität, die das McrBC-System in *E. coli* zeigt, ein entwicklungsgeschichtlich gesehen junges Derivat einer ursprünglich anderen Aktivität, in der McrB_s eine andere Funktion besaß. Für eine solche Annahme gibt es noch weitere Hinweise ganz anderer Art, auf die später eingegangen werden soll (vgl. S. 240). Einen zusätzlichen Hinweis, der jedoch direkt mit diesem Phänomen zu tun hat, liefern die zum Teil in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur thermischen Proteinstabilität der Untereinheit McrB. Hier konnte gezeigt werden, dass das McrB-Protein nicht nur funktionell in eine aminoternale Domäne mit Fähigkeit zur spezifischen DNA-Bindung und eine carboxyterminale Domäne mit Fähigkeit zur Bindung und Hydrolyse von GTP trennbar ist. Beide Domänen lassen sich auch getrennt voneinander exprimieren (McrB₁₋₁₆₂, McrB₁₋₁₇₀ und McrB₁₋₁₉₀ als isolierte N-terminale Domäne sowie McrB_s [McrB₁₆₉₋₄₆₅] als C-terminale Domäne von McrB) und ergeben lösliche Proteine (vgl. auch Kapitel *Proteinaufreinigung*, S. 114), die die ihren Abschnitten zugeordnete Funktion (N-terminale Domäne: spezifische DNA-Bindung; C-terminale Domäne: GTP-Bindung und -Hydrolyse) auch bei Trennung von der anderen Domäne uneingeschränkt hervorbringen (vgl. hierzu auch zusätzliche Resultate der Arbeitsgruppe des hiesigen Institutes in den Artikeln von Gast *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1999a, b). Dies ist besonders für die carboxyterminale Domäne

interessant, da entsprechend isolierte Domänen anderer GTPasen oft stark veränderte Eigenschaften aufweisen, wie z. B. im Falle von EF-Tu. Die isolierte GTPase dieses Elongationsfaktors bindet GDP wesentlich schlechter und besitzt einen deutlich höheren intrinsischen GTP-Umsatz als im vollständigen Protein (Krab & Parmeggiani, 1998). Während das vollständige McrB-Protein, wie in dieser Arbeit in Bezug auf die Fähigkeit der spezifischen DNA-Bindung und in Pieper *et al.* (1997) in Bezug auf die GTPase-Aktivität gezeigt, thermisch sehr instabil ist und schon durch zeitlich kurzen Einfluss höherer Temperaturen inaktiviert wird, zeigt sich die isolierte, aufgereinigte aminoternale Domäne diesbezüglich wesentlich robuster. Dies bedeutet, dass sie im McrB-Gesamtprotein auf Kosten der eigenen, inhärenten und ausgeprägten thermischen Funktionsstabilität strukturell mit der GTP-bindenden Domäne verbunden ist. Dieses pseudoheterodimere Fusionsprotein besitzt jedoch eine Eigenschaft, welche die isolierten Domänen auch in gemeinsamer Anwesenheit nicht hervorbringen: die Fähigkeit der DNA-Spaltung unter Wechselwirkung mit McrC. Weder McrB₁₋₁₆₂, McrB₁₋₁₇₀ noch McrB₁₋₁₉₀ vermögen in Komplementation mit McrB_s (McrB₁₆₉₋₄₆₅) und McrC spezifische DNA-Spaltung hervorzurufen (Pieper *et al.*, 1999b). Die auffallend große Stabilität der isolierten DNA-bindenden Domäne sowie die uneingeschränkte individuelle Funktion beider Domänen im Falle isolierter Expression läßt vermuten, dass das McrB-Protein kein Ergebnis einer evolutiven Entwicklung eines singulären Vorläuferproteins ist, sondern das (phylogenetisch weiterentwickelte) Produkt einer genetischen Fusion zweier vormals unabhängiger Gene. Weitere Hinweise auf die evolutive Entwicklung des McrBC-Systems werden weiter unten in dieser Diskussion besprochen (s. S. 240).

2. Interaktion des McrBC-Systems mit DNA

Für das Hervorbringen einer Restriktionsaktivität durch das McrBC-System ist nur die Anwesenheit der Untereinheiten McrB und McrC, aber nicht die der Untereinheit McrB_s erforderlich. Wie in dieser Arbeit gezeigt und auch an anderer Stelle beschrieben, besitzt die Untereinheit McrC keine Fähigkeit einer sequenzspezifischen DNA-Interaktion. Die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz, nämlich 5'-RM-3' (mit M = 5-Methylcytosin) erfolgt ausschließlich durch die Untereinheit McrB. Wie ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt, befindet sich der Abschnitt, der für die Erkennung und die Bindung der für das McrBC-System spezifischen DNA-Sequenz verantwortlich ist, innerhalb der ersten 162

Aminosäurereste von McrB, die auch als isoliertes Teilprotein (McrB₁₋₁₆₂) mit vollständig erhaltener Fähigkeit der DNA-Bindung exprimiert werden können. Die Zuordnung der spezifischen DNA-Interaktion durch McrB zum aminoterminalen Teil des Proteins bestätigen auch Experimente mit anderen Varianten N-terminaler Teilproteine von McrB, wie in dieser Arbeit mit McrB₁₋₁₇₀ und McrB₁₋₁₉₀, oder durch unabhängige Experimente der hiesigen Arbeitsgruppe an anderen DNA-Substraten (Gast *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1999b).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, bindet die isolierte DNA-Bindungsdomäne in Form von McrB₁₋₁₆₂ im Verhältnis 1 : 1 an die im Substrat vorhandenen McrBC-Erkennungselemente und bildet keine höhermolekularen Proteinkomplexe an der DNA. Auch bei relativ geringen Abständen der McrBC-Erkennungselemente (Separation durch 66 bp) erfolgen die Bindungsereignisse von McrB₁₋₁₆₂ unabhängig voneinander an die spezifischen Bindungsstellen. Damit unterscheidet sich das Bindungsverhalten der kürzestkettigen der hier untersuchten N-Domänenvarianten vom vollständigen McrB-Protein und auch von den etwas längerkettigen Varianten McrB₁₋₁₇₀ und McrB₁₋₁₉₀. Wie hier durch Retardationsexperimente gezeigt werden konnte, binden diese Proteine mit einer etwas stärker ausgeprägten Affinität an das Substrat und bilden spezifische *shift*-Banden im *mobility-shift*-Gel, deren Lage sich mit steigender Proteinkonzentration etwas in Richtung langsam laufenderer Komplexe verschiebt. Dieses Phänomen wurde auch bei Verwendung anderer DNA-Substrate beobachtet (Wünsch, 2000) und lässt darauf schließen, dass es bei Erhöhung der Proteinkonzentration zu Umlagerungen im Protein-DNA-Komplex kommt. Hierbei mögen intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielen, die im Falle des vollständigen McrB-Proteins mit Sicherheit stattfinden. Für McrB konnte in dieser Arbeit mit einem DNA-Substrat, das nur eine einzige McrBC-Erkennungssequenz enthält, gezeigt werden, dass an diese singuläre spezifische Bindungsstelle mit nur einer einzigen 5-Methyl-Modifikation wesentlich mehr McrB-Proteine binden als nur eine einzige Untereinheit. Es sind nach den hier durch Messungen mit BIAcore-Instrumenten erhaltenen Daten höchstwahrscheinlich vier McrB-Untereinheiten, die sich bei Anwesenheit beider Kofaktoren des McrBC-Systems (Mg²⁺, GTP) an einer singulären McrBC-Erkennungssequenz zu einem Komplex zusammenlagern (s. S. 159).

Die zwischen den McrB-Proteinen bestehenden intermolekularen Wechselwirkungen, die, wie oben erwähnt, durch die isolierte N-terminale Domäne McrB₁₋₁₆₂ nicht ausgebildet werden, beeinflussen auch die Bindung von McrB-Untereinheiten an relativ dicht beieinander liegende spezifische Bindungsstellen. Im Falle der mit der BIAcore-Technik untersuchten DNA mit einem Abstand von 66 bp zwischen den McrBC-Erkennungssequenzen wurde kein

McrB/Bindungsstellen-Verhältnis von 4 : 1 (8 : 2) beobachtet, welches eine Unabhängigkeit der Bindungsereignisse an beiden McrBC-Erkennungssequenzen bedeuten würde. Vielmehr zeigen die hier erhaltenen Daten eine Interaktion von McrB zu spezifischer Bindungsstelle im Verhältnis 3 : 1 (6 : 2) bei Anwesenheit beider Kofaktoren. Über die bestehende Distanz von 66 bp beeinflussen sich also die Bindungsereignisse der McrB-Untereinheiten an beiden Bindungsstellen messbar. Dies legt nahe, dass an zwei derart auseinanderliegenden Erkennungssequenzen nicht zwei getrennte McrB-Komplexe gebildet werden, sondern ein hochmolekularer Komplex. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse sog. *footprint*-Experimente gestützt, die in der hiesigen Arbeitsgruppe (Wünsch, 2000) und anderswo durchgeführt wurden (Stewart *et al.*, 2000). Diese Experimente, die Analysen des hydrolytischen Abbaus spezifischer Substratmoleküle durch unspezifische Endonukleasen in An- und Abwesenheit zuvor induzierter Bindung der McrB-Untereinheit an diese Substrate darstellen, zeigen einen Schutz der Substrat-DNA vor einem unspezifischen, enzymatischen Abbau nicht nur im Bereich der McrBC-Erkennungssequenzen, sondern auch teilweise zwischen den Erkennungselementen. Diese Daten bestätigen die Annahme der Entstehung von McrB-Komplexen, die über den jeweils die McrBC-Erkennungselemente trennenden, relativ kurzen Bereich (in dem hier verwendeten Substrat: 66 bp; in dem von Wünsch [2000] verwendeten Substrat: 34 bp; in dem von Stewart *et al.* [2000] verwendeten Substrat: 59 bp) hinweg interagieren. Die gegenseitige Beeinflussung der McrB-Untereinheiten bei der Bindung der relativ eng benachbart liegenden Erkennungssequenzen des McrBC-Systems bleibt auch bei Abwesenheit von GTP oder beider Kofaktoren bestehen, wie durch die beschriebenen BIAcore-Messungen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Damit unterscheiden sich die an diesem Substrat gebildeten McrB-Komplexe von denjenigen, die aus der Bindung von McrB-Untereinheiten an ein DNA-Substrat entstehen, dessen McrBC-Erkennungssequenzen deutlich weiter auseinander liegen. Wie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Aufnahmen mit einem Rasterkraft-Mikroskop zeigen, erfolgt die Bindung von McrB an beide spezifischen Bindungsregionen des DNA-Substrats Pf1793, dessen zwei McrBC-Erkennungselemente durch 269 bp voneinander getrennt sind, unabhängig voneinander.

Die Bindung von McrB-Untereinheiten an die deutlich voneinander getrennten McrBC-Erkennungselemente der DNA Pf1793 erfolgt jedoch nicht nur voneinander unabhängig, sondern auch mit unterschiedlicher Präferenz. Wie die statistische Verteilung der sich an beiden Erkennungselementen bildenden McrB-Komplexe bei niedriger und höherer Konzentration der McrB-Untereinheit zeigt, erfolgt die Bindung von McrB an eines der

beiden Elemente deutlich bevorzugt und schon bei niedrigeren Konzentrationen von McrB. Dieses McrBC-Erkennungselement enthält zwei *in trans* lokalisierte, gegenläufig orientierte Sequenzen des Typs 5'-GM-3', während das andere Element aus nur einer singulären 5'-GM-3'-Sequenz besteht. Demnach führt hier eine Anhäufung von systemspezifischen Erkennungssequenzen in unmittelbarer Nähe (innerhalb eines Erkennungselementes) zu einer deutlich erhöhten Bindungsaffinität der McrB-Untereinheit zum DNA-Substrat. Ob die an zwei Erkennungssequenzen innerhalb eines Elementes gebildeten McrB-Komplexe unter gleichen Bedingungen einen identischen Aufbau besitzen wie diejenigen, die an einer singulären Erkennungssequenz entstehen, kann anhand der rasterkraftmikroskopischen Betrachtung der Protein-DNA-Komplexe nicht gesagt werden.

In dieser Arbeit wurden mit BIAcore-Instrumenten Bindungsstudien von McrB unter verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen DNA-Substraten durchgeführt. Die dadurch gewonnenen Resultate zeigen den Einfluss der Kofaktoren Mg^{2+} und GTP auf das DNA-Bindungsverhalten der McrB-Untereinheit deutlicher, als dies zuvor mit Hilfe von Retardationsexperimenten erreicht wurde (Krüger *et al.*, 1995b; Gast *et al.*, 1997). McrB bindet auch in Abwesenheit beider Kofaktoren an spezifisch methylierte DNA. Bei höheren Konzentrationen von McrB, als sie bei den Messungen von Gast *et al.* (1997) verwendet wurden, werden bei den BIAcore-Messungen auch unspezifische DNA-Bindungseffekte sichtbar, die sich jedoch durch Zugabe unspezifischer Kompetitor-DNA aus der Messung eliminieren lassen (vgl. S. 105). Die Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ während der Bindungsreaktion beeinflusst den Aufbau der McrB-Komplexe sowohl an singulären McrBC-Erkennungssequenzen als auch an systemspezifischen Sequenzen, die durch 66 bp separiert im gleichen DNA-Molekül vorliegen. Dieses Phänomen konnte von Stewart *et al.* (2000) durch Anwendung der *mobility-shift*-Methode nicht gezeigt werden. Durch die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen wächst die durchschnittliche Masse der an einer singulären Erkennungssequenz gebildeten McrB-Komplexe bei gleichen Konzentrationen an McrB jeweils um den Faktor 1.3. Bei Bindung von McrB an eine DNA mit zwei durch 66 bp separierten Erkennungssequenzen des McrBC-Systems führt die Anwesenheit von Magnesiumionen zu einer Massenzunahme um den Faktor 1.7. Dies läßt vermuten, dass durch den Kofaktor Mg^{2+} im Wesentlichen nur die McrB-DNA-Interaktion verstärkt wird, und nur im geringen Ausmaße die intermolekulare McrB-McrB-Interaktion. Die zusätzliche Anwesenheit von GTP erhöht in beiden Fällen die DNA-Affinität von McrB und die damit verbundene Komplexbildung nochmals um den Faktor 1.5, wobei der Aufbau der Komplexe deutlich moduliert wird. Die bei Anwesenheit von GTP maximale Anzahl von vier McrB-Proteinen pro

singulärer Erkennungssequenz im DNA-Substrat (bzw. max. sechs McrB bei zwei durch 66 bp separierten McrBC-Erkennungssequenzen) wird in Abwesenheit dieses Kofaktors deutlich überschritten. Durch die unterschiedliche, GTP-abhängige Form der Ausbildung dieser McrB-Komplexe an spezifischen DNA-Sequenzen können in diesem Falle deutlich größere Komplexe entstehen, die aus mehr McrB-Untereinheiten pro McrBC-Erkennungssequenz bestehen. Dabei binden die zusätzlichen McrB-Untereinheiten jedoch mit deutlich verminderter Affinität an die DNA-Protein-Komplexe. Die durch die Anwesenheit von GTP erhöhte Bindungsaffinität von McrB zu spezifischen Sequenzen sowie die durch GTP erfolgende Modulation der durch die DNA-Bindung induzierten Komplexbildung erklärt die parallel bei Retardationsexperimenten beobachtete Erscheinung, dass GTP die Größe von an DNA entstehenden McrB-Komplexen reduziert (Gast *et al.*, 1997). Da GTP für die DNA-Spaltreaktion durch das McrBC-System ein essenzieller Kofaktor ist, spielt GTP bzw. die Hydrolyse von GTP möglicherweise nicht nur bei der hier gezeigten Ausbildung der nur aus McrB-Untereinheiten bestehenden Komplexe eine Rolle, sondern auch bei der Bildung und Erhaltung DNA-spaltaktiver Komplexe, die sich aus McrB- und McrC-Untereinheiten zusammensetzen. Die Verwendung eines nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons (GTP- γ S) während des Aufbaus der McrBC-Komplexe an spezifischer DNA zeigt, dass die Hydrolyse des Kofaktors einen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung der McrBC-Komplexe besitzt (Stewart *et al.*, 2000). Die Interpretation dieser Befunde ist, dass die Hydrolyse von GTP ein notwendiger Vorgang zur Bildung DNA-spaltaktiver McrBC-Komplexe an spezifischen DNA-Sequenzen ist. Ein ähnliches Phänomen ist auch von anderen Proteinsystemen bekannt, die GTP-hydrolysierende Untereinheiten enthalten, so z. B. von Tubulinfasern, deren Formation und Dissoziation GTP-abhängig ist (Carlier & Pantaloni, 1989). In diesem Zusammenhang könnten die in Anwesenheit von GTP gebildeten McrB-DNA-Komplexe funktionelle Vorläuferkomplexe darstellen, die durch weitere Komplexbildung mit der McrC-Untereinheit zu DNA-spaltaktiven McrBC-Komplexen führen, während die größeren, in Abwesenheit von GTP gebildeten McrB-DNA-Komplexe unspezifische Komplexe darstellen könnten, die nicht ohne Weiteres nach Zugabe von McrC zu funktionellen McrBC-Komplexen führen.

Die an spezifischen DNA-Substraten gebildeten Proteinkomplexe, die sowohl aus der McrB- als auch aus der McrC-Untereinheit bestehen, können wesentlich größere Ausmaße annehmen als unter identischen Bedingungen bei alleiniger Anwesenheit nur einer der beiden Untereinheiten. Auch die Bindung der Untereinheiten an unspezifische DNA-Sequenzen wird durch die synchrone Anwesenheit beider Untereinheitenspecies drastisch verstärkt. Dies wird

eindrucksvoll durch das in Abbildung 14 (S. 164) gezeigte Sensorgramm demonstriert. Unter Bedingungen, bei denen die McrB-Untereinheit alleine gut an die verwendeten spezifischen Substrate bindet, bewirkt die Zugabe von McrC, das für sich alleine in der verwendeten Konzentration keinerlei DNA-Bindungseigenschaften besitzt, eine Massenvergrößerung der spezifisch an die DNA gebundenen Komplexe um den Faktor 10. Die Massenvergrößerung an unspezifischen Sequenzen findet in einer solchen Situation sogar noch zusätzlich in deutlich größerem Umfang statt. Derartige Beobachtungen wurden parallel auch in Retardationsexperimenten gemacht, wo hochmolekulare, kaum in das *mobility-shift*-Gel einwandernde McrBC-Komplexe gezeigt wurden (Gast *et al.*, 1997). Stewart *et al.* (2000) konnten später derartige durch McrBC entstehende *supershift*-Banden im Retardationsgel nur unter bestimmten Bedingungen zeigen. Die Entstehung derartig hochmolekularer McrBC-Komplexe an McrBC-Erkennungssequenzen könnte auch die Entstehung der in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit zu sehenden großglobulären Strukturen an der spezifischen DNA Pf1793 nach Inkubation mit McrB und McrC erklären (vgl. Abbildung 11 D). Leider erlauben diese Aufnahmen entgegen der Erwartung keine Aussage darüber, ob der zwischen den beiden durch 269 bp separierten McrBC-Erkennungselementen liegende DNA-Abschnitt in die gebildeten Komplexe involviert ist oder diesen Strukturen lediglich peripher anheftet und im Falle größerer Distanz zwischen den McrBC-Erkennungselementen als freie Schleife sichtbar werden könnte.

Eine weitere Eigenschaft der McrBC-Restriktionsendonuklease kann zwar als eine logische Konsequenz ihres DNA-Bindungsverhaltens interpretiert werden, soll aber dennoch an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Gemeint ist die immer wieder, nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, auftretende Beobachtung, dass bei der sich an eine experimentell erfolgten Substratspaltung durch McrBC oftmals anschließenden gelelektrophoretischen Analyse die entstandenen DNA-Spaltprodukte nur schlecht in das Gel einwandern. Dies läßt sich durch Zugabe von etwas SDS in die zu analysierende Lösung ändern (vgl. S. 111) und ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die DNA-spaltaktiven McrBC-Komplexe (oder sich daraus ableitende Komplexe) nach einer erfolgten Spaltung der Substrat-DNA mit zumindest einem der entstandenen Produkte assoziiert bleiben. Die meisten der bekannten Restriktionsenzyme dissoziieren nach der Spaltung ihrer Erkennungssequenz von den Spaltprodukten ab. Im Falle des McrBC-Systems, das die DNA außerhalb seiner Erkennungssequenz spaltet, bleiben jedoch die Erkennungssequenzen und somit die Möglichkeit der spezifischen DNA-Bindung an diese Sequenzen durch das System erhalten. Ein derartiges Verhalten ist auch für Typ I

Restriktionsenzyme beschrieben worden, die ihre Substrat-DNA ebenfalls außerhalb ihrer Erkennungssequenz spalten.

3. Anforderungen des McrBC-Systems an das DNA-Substrat und Einfluss der DNA auf die Restriktionsaktivität des McrBC-Systems

Die Restriktionsendonuklease McrBC vermag eine aus nur zwei Nukleotiden bestehende DNA-Sequenz spezifisch von anderen Sequenzen zu unterscheiden. Dies ist um so mehr erstaunlich, da die erste Position (das 5' stehende Nukleotid) darüber hinaus nicht exakt definiert ist und lediglich eine Purinbase (R) enthalten muss, und sich die spezifische Base der zweiten Position (dem 3' stehenden Nukleotid) nur durch das Vorhandensein einer Methylgruppe (^mC) von einer anderen in DNA vorkommenden Base (C) unterscheidet. Diese Methylgruppe kann sogar noch an unterschiedlichen Positionen an der Base lokalisiert sein (^m4C oder ^m5C) oder durch eine Hydroxymethylgruppe (hm⁵C) ersetzt werden. Wie im vorigen Kapitel dargelegt, reichen die genannten Unterschiede zwischen den Sequenzen 5'-R^mC-3' und 5'-YC-3' (und allen anderen Dinukleotid-Sequenzen) aus, um eine deutlich messbare spezifische Bindung an 5'-R^mC-3' sowohl durch die McrB-Untereinheit alleine als auch durch McrBC-Komplexe zu erhalten. Mit der Bindung an eine in linearer DNA nur einmal vorkommende Erkennungssequenz kann die Endonuklease McrBC jedoch nicht die Restriktionsaktivität erzielen, die zu der Entdeckung des Systems führte. Um durch McrBC gespalten werden zu können, muss das DNA-Substrat also mindestens eine weitere Anforderung der McrBC-Restriktionsendonuklease erfüllen.

Diese zusätzliche Anforderung des McrBC-Systems an ein spaltbares DNA-Substrat wird durch die Anwesenheit einer zweiten 5'-R^mC-3' Sequenz erfüllt. Eine allosterische Aktivierung der Restriktionsaktivität von McrBC durch *in trans* in anderen DNA-Molekülen liegende Erkennungssequenzen wurde bisher nicht beobachtet und konnte auch in dieser Arbeit im Rahmen näherer Untersuchungen zu diesem Phänomen nicht nachgewiesen werden. Sehr wohl bewirkt jedoch eine zweite, im gleichen linearen DNA-Molekül liegende McrBC-Erkennungssequenz eine Restriktionsaktivität durch McrBC, wenn diese Sequenz in einem Abstand von ca. 40 bp bis etwa 80 bp zu der ersten 5'-R^mC-3' Sequenz liegt. Diese Entdeckung führte zu der Angabe, die Konsensus-Erkennungssequenz der McrBC-

Restriktionsendonuklease sei $5'-R^mCN_{40-80}R^mC-3'$, wobei McrBC zwischen beiden R^mC -Sequenzen einen Doppelstrangbruch in der DNA erzeugte (vgl. *Einleitung*). Die formelle Angabe der Erkennungssequenz von McrBC in der Art $5'-R^mCN_{40-80}R^mC-3'$ beschreibt die Anforderung des McrBC-Systems an seine Substrat-DNA in Bezug auf spezifische Bindung jedoch falsch (s. o.) und auch in Bezug auf eine Restriktionsspaltung nur ungenügend. Dies zeigen u. a. die Daten dieser Arbeit, nach denen die Erkennungssequenzen ($5'-R^mC-3'$), um eine DNA-Spaltung durch McrBC zu erzielen, zum Ersten auch deutlich andere (größere) Abstände und zum Zweiten eine andere Orientierung zueinander besitzen dürfen sowie zum Dritten das Vorhandensein weiterer McrBC-Erkennungssequenzen die DNA-Spaltung durch das McrBC-System deutlich beeinflussen kann. Die Resultate dieser Arbeit, die Erkenntnisse über DNA-Sequenzen liefern, die durch McrBC spaltbar oder nicht spaltbar sind, wurden bei der Vorstellung der entsprechenden Ergebnisse schon besprochen. Die daraus zu ziehenden Folgerungen sollen hier kurz zusammengefasst werden.

Auffällig an den Resultaten der hier durchgeführten Spaltexperimente ist, dass hochmolekulare DNA, die eine Vielzahl an $5'-R^mC-3'$ Sequenzen enthält, ein deutlich besseres Spaltsubstrat für die McrBC-Restriktionsendonuklease darstellt als kleinere DNA-Moleküle mit nur einer geringen Anzahl solcher Sequenzen. Dies zeigen übereinstimmend Experimente, in denen für die enzymatische Spaltreaktion durch McrBC Plasmid-DNA, Fragmente dieser Plasmide, modifizierte Abschnitte dieser Plasmide oder synthetische DNA-Konstrukte als Substrate verwendet wurden. Hierbei zeigte sich, dass bestimmte, in den Plasmiden vorkommende Erkennungssequenzen im Kontext der anderen, im jeweiligen Plasmid vorkommenden McrBC-Erkennungssequenzen zu einer sehr guten DNA-Spaltung durch McrBC führen, während sie in isolierten Abschnitten kaum eine spezifische Spaltreaktion durch McrBC hervorzurufen vermögen. Interessanterweise gilt dies, obwohl beispielsweise 16 der 18 im zirkularen Plasmid pBW201 vorkommenden McrBC-Erkennungselemente einen Abstand voneinander haben, der nicht dem favorisierten Bereich von 40 bis 80 bp entspricht. Die Anwesenheit zusätzlicher McrBC-Erkennungssequenzen im DNA-Substrat kann also die Effizienz der DNA-Spaltung zwischen zwei McrBC-Erkennungselementen durch McrBC sehr verstärken, auch wenn deren Entfernungen zu den anderen Elementen deutlich mehr oder weniger als 40 bis 80 bp betragen. Ein deutliches Beispiel hierfür zeigt der Vergleich der McrBC-Spaltung der Plasmidfragmente Pf740 (s. S. 190) und Pf430 (s. S. 189), die beide aus dem Plasmid pBW201 stammen. Pf430 besitzt zwei durch 88 bp separierte McrBC-Erkennungselemente und ist identisch mit dem vorderen Teil von Pf740, das zudem zwei weitere McrBC-Erkennungselemente enthält. Während

Pf430 ein schlechtes Spaltsubstrat für die McrBC-Restriktionsendonuklease darstellt, erfolgt in Pf740 eine ausgezeichnete Spaltung durch McrBC zwischen den beiden McrBC-Erkennungselementen, die auch Pf430 besitzt (und darüber hinaus auch zwischen den beiden zusätzlichen McrBC-Elementen). Der aktivierende Einfluss der zusätzlichen Anwesenheit von zwei McrBC-Erkennungselementen in Pf740 auf die Spaltung von McrBC zwischen beiden in Pf430 vorhandenen Elementen ist also sehr groß. Bestätigt wird diese Annahme durch den Vergleich der Spaltung der PCR-Produkte Sb637 (s. S. 197) und Sb157-01.01 (s. S. 198) durch das McrBC-System. Die durch 90 bp separierten McrBC-Erkennungssequenzen in Sb157-01.01 führen zu einer recht guten Spaltung durch McrBC, die aber durch die zusätzliche Anwesenheit einer weiteren, durch 221 bp distanzierten McrBC-Erkennungssequenz im DNA-Substrat Sb637 weiter verstärkt wird. Demgegenüber zeigt in einem anderen DNA-Substrat (Pf810) eine dritte McrBC-Erkennungssequenz einen deutlich geringeren aktivierenden Effekt. In der DNA Pf810, die wie Sb637 beide in Sb157-01.01 vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen enthält, liegt die dritte McrBC-Erkennungssequenz verglichen mit der Situation in Sb637 auf der anderen Seite der beiden Erkennungssequenzen aus Sb157-01.01 und ist wesentlich weiter von diesen distanziert (durch 515 bp) als in Sb637. Demnach nimmt der Einfluss zusätzlich vorhandener McrBC-Erkennungssequenzen auf die DNA-Spaltaktivität des McrBC-Restriktionssystems mit zunehmendem Abstand ab. Das in dieser Arbeit häufig auftretende Phänomen, dass auch zwei McrBC-Erkennungssequenzen, die einen z. T. deutlich größeren Abstand als 80 bp voneinander haben, eine Restriktionsspaltung durch McrBC auslösen können, wurde auch in den Experimenten von Stewart & Raleigh (1998) beobachtet. Die Autoren berichten die McrBC-Spaltbarkeit von linearer DNA, deren beide McrBC-Erkennungssequenzen bis zu 1977 bp voneinander entfernt sind.

Einen weiteren Einfluss auf die DNA-Spaltung durch McrBC kann auch die Position der McrBC-Erkennungssequenzen im DNA-Substrat besitzen. Dies zeigt der direkte Vergleich der McrBC-Spaltung der DNA-Substrate Pf1364 (s. S. 182) und Sb637, die beide einen identischen Abschnitt von pBW201 enthalten, der nach der entsprechend durchgeführten Methylierung drei McrBC-Erkennungssequenzen aufweist. Bei gleichen Abständen der Erkennungssequenzen zueinander sind diese drei McrBC-Erkennungssequenzen im Verhältnis zu der Gesamtlänge der jeweiligen DNA in beiden Substraten sehr unterschiedlich verteilt. In Pf 1364 sind sie einseitig und sehr randständig lokalisiert, während sie bei Sb637 in der gesamten DNA verteilt sind. Beide DNA-Moleküle stellen vergleichbar gute Spaltsubstrate für die McrBC-Restriktionsendonuklease dar. In Sb637 spaltet das McrBC-

System die DNA bevorzugt zwischen den beiden hinteren McrBC-Erkennungselementen, während nach den vorliegenden Daten die Spaltung von Pf1364 durch McrBC bevorzugt zwischen den ersten beiden Elementen in der Nähe der ersten Erkennungssequenz erfolgt. Dies bedeutet für Pf1364 eine Verschiebung der präferierten Spaltposition in Richtung des langen Abschnitts, der keine McrBC-Erkennungssequenzen trägt. Der Einfluss der Länge der die McrBC-Erkennungssequenzen umgebenden DNA auf die Spaltreaktion ist nicht klar, könnte aber mit den hochmolekularen spaltaktiven Komplexen des McrBC-Systems zusammenhängen, die an spezifischer DNA mit mehreren Erkennungssequenzen gebildet werden (s. o.). Nach den Ergebnissen der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die McrBC-Komplexe sehr lange DNA-Abschnitte in die Komplexbildung mit einbeziehen. Der Abstand der dritten McrBC-Erkennungssequenz zum rechten Ende der DNA beträgt in Pf1364 lediglich 62 bp und ist somit um 65 % kürzer als in Sb637, während umgekehrt der Abstand der ersten McrBC-Erkennungssequenz zum linken Ende der DNA in Pf1364 mit 985 bp fast siebenmal länger ist als in Sb637. Die DNA Pf1364 bietet also den an ihr entstehenden McrBC-Komplexen in Richtung der ersten McrBC-Erkennungssequenz wesentlich mehr Platz als Sb637, deren linke McrBC-Erkennungssequenz mehr randständig ist als die rechte.

Dem McrBC-System auf der DNA mehr Platz für eine Bildung der hochmolekularen Komplexe zu geben führt aber nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Restriktionsaktivität des Systems. Dies zeigen Experimente mit dem kurzen Substrat Sb61-11.11, dessen durch 34 bp getrennte McrBC-Erkennungselemente lediglich 9 bzw 10 nt von den Enden der DNA entfernt lokalisiert sind, und Derivaten mit längeren flankierenden Sequenzen. Sb61-11.11 wird durch McrBC kaum gespalten. Der Einfluss der Entfernung der in diesem Substrat vorhandenen McrBC-Erkennungssequenzen zu den Enden der DNA wurde in dieser Arbeit überprüft, indem die DNA in das Plasmid pMcrSb1 inkloniert und aus den daraus entstandenen Plasmiden pMcrSb2 und pMcrSb3 restriktionsenzymatisch mit *HpaI* herausgeschnitten wurde. In dem so erhaltenen Plasmidfragment Pf1083 befindet sich die Sequenz der DNA Sb61-11.11 relativ zentral mit Abständen von jeweils etwa 500 bp zu beiden Enden der DNA. Diese Vergrößerung des Substratmoleküls unter Beibehaltung des die beiden McrBC-Erkennungselemente trennenden Abstandes erbrachte keine Verbesserung der Spalteffizienz durch das McrBC-System. Daraus folgt, dass der spaltungslimitierende Faktor in Sb61-11.11 nicht der Abstand der McrBC-Erkennungselemente zu den DNA-Enden ist, sondern der die beiden McrBC-Erkennungselemente trennende Abschnitt von 34 bp für eine effiziente Spaltung der DNA durch das McrBC-System zu gering ist. Eine Verlängerung der

die McrBC-Erkennungselemente umgebende DNA kann daher in diesem Falle nicht zu einer Aktivierung der DNA-Spaltung durch das McrBC-System führen.

Interessanterweise ist der Erfolg einer DNA-Spaltung durch die McrBC-Restriktionsendonuklease nicht abhängig von der Orientierung der McrBC-Erkennungssequenzen in der DNA. Die in Bezug zu dieser Aussage stehenden Experimente dieser Arbeit mit den DNA-Substraten der Sb128- bzw. Sb157-Gruppe bestätigen dieses von Sutherland *et al.* (1992) beschriebene Phänomen. Die Spaltung der DNA-Substrate erfolgt, wie hier gezeigt und auch anderswo beschrieben, stets zwischen zwei McrBC-Erkennungssequenzen. Die in der vorliegenden Arbeit zu diesem Punkt durchgeführte exakte Bestimmung der durch McrBC verwendeten Schnittpositionen zeigt einige interessante Details über die Funktionsweise der McrBC-Restriktionsendonuklease. So konnte mit den Substraten der Sb157-Gruppe gezeigt werden, dass die durch McrBC bevorzugten Schnittpositionen deutlich in Richtung einer der beiden Erkennungssequenzen liegen. Bei einer zwischen den betrachteten McrBC-Erkennungssequenzen liegenden identischen Sequenz werden die durch das McrBC-System bevorzugt verwendeten Schnittpositionen bei Verschiebung der Erkennungssequenzen um 4 bp relativ zu dieser Sequenz weder im gleichen Raster verschoben wie die Erkennungssequenzen, noch verbleiben sie an den identischen Stellen. Ebenso bringt auch die Vergrößerung des Abstandes beider McrBC-Erkennungssequenzen um 4 bp keine einheitliche Veränderung. Der Vergleich der durch die Substrate der Sb157-Gruppe gewonnenen Daten mit den Ergebnissen aus der Spaltung von Sb128-10.01 zeigt, dass die McrBC-Restriktionsendonuklease die einzelnen Stränge des DNA-Moleküls an mehreren Positionen zu spalten vermag, wobei die dabei bevorzugten Spaltpositionen unabhängig vom Abstand der McrBC-Erkennungssequenzen und unabhängig von der dazwischen liegenden DNA-Sequenz stets 10 bis 11 bp auseinander liegen. Die Häufigkeit der Spaltung der einzelnen DNA-Stränge an bestimmten Stellen nimmt in unmittelbarer Nachbarschaft zu den maximal verwendeten Positionen mit zunehmendem Abstand zu diesen Stellen ab. Innerhalb eines Bereiches von etwa 60 bp konnten bis zu fünf solcher verstärkt durch das McrBC-System frequentierten Spaltpositionen festgestellt werden, wobei die Spalthäufigkeit insgesamt zu den Rändern dieses Bereiches abnimmt. Die etwa durch 10 bp separierten maximal durch McrBC verwendeten Spaltpositionen werden also nicht mit gleicher Häufigkeit benutzt. Die einer McrBC-Erkennungssequenz nächste Position, an der durch das McrBC-System Spaltungen des betrachteten Einzelstranges der *dsDNA* durchgeführt werden, liegt uneinheitlich 9 bzw. 18 bp (Sb157-DNA), oder 6 bzw. 8 bp (Sb128-10.01) von der McrBC-Erkennungssequenz entfernt. Etwa von diesen Positionen ausgehend sind die aufeinanderfolgenden Positionen

maximaler Spaltaktivität durch McrBC periodisch jeweils 10 bis 11 bp voneinander entfernt. Drei Punkte sind im Zusammenhang mit diesem Spaltpattern auffällig: 1. Der periodisch durch McrBC eingehaltene Abstand maximaler Spaltaktivität von 10 bis 11 bp pro Strang entspricht einer kompletten Windung der DNA-Doppelhelix (ca. 10.5 bp). 2. Dieser Abstand wird nicht akribisch eingehalten, denn Abweichungen von dieser Distanz um ein bis wenige Basenpaare sind durchaus festzustellen. 3. Im DNA-Doppelstrang stehen die maximal frequentierten Spaltpositionen der jeweiligen Einzelstränge bei unterschiedlichen Abständen der beiden Erkennungssequenzen nicht in einem definierten Verhältnis zueinander. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die McrBC-Restriktionsendonuklease keine geometrisch festgelegte Doppelstrang-Spaltung der Substrat-DNA durchführt, sondern die DNA-Spaltung letztlich auf einen durch positionsunabhängige Einzelstrang-Spaltungen entstehenden Doppelstrang-Bruch zurückzuführen ist.

Die Periodizität des Produktmusters der McrBC-Spaltung wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals in dieser ausgeprägten Form gezeigt. Die Resultate anderer Arbeitsgruppen bestätigen, dass die Restriktionsendonuklease McrBC entsprechende DNA-Substrate zwischen den beiden Erkennungssequenzen, unabhängig von deren Entfernung voneinander, hauptsächlich ungefähr 30 bp von den Erkennungssequenzen entfernt einmalig pro Molekül durchspaltet (Stewart & Raleigh, 1998). Die Angabe der Entfernung hauptsächlich auftretender Doppelstrangbrüche von den McrBC-Erkennungssequenzen wurde später, abhängig von dem verwendeten Substrat und dessen betrachteter McrBC-Erkennungssequenz, auf 30 bis 35 bp, 25 bis 28 bp, 33 bis 35 bp bzw. 28 bis 30 bp präzisiert, wobei zusätzliche Einzelstrangspaltungen registriert wurden (Panne *et al.*, 1999). Die bei den Positionen dieser Einzelstrangspaltungen (*nicking* der *dsDNA*) ebenfalls ansatzweise erkennbare Periodizität von 10 bis 11 bp wird von den Autoren aber nicht diskutiert.

Ob und inwiefern der einer kompletten DNA-Windung entsprechende Abstand der von McrBC präferierten Spaltstellen innerhalb eines Stranges tatsächlich von der Helixwindung des DNA-Substrats beeinflusst oder abhängig ist, oder ob dieser Abstand nur durch die Struktur der McrBC-Komplexe hervorgerufen wird und eher zufällig dieser Umwindungszahl entspricht, kann derzeit nicht gesagt werden. Die möglichen Hintergründe dieses Phänomens werden später in dieser Arbeit diskutiert.

4. Das McrBC-System und andere Proteinsysteme - ein Vergleich

Zur Ausübung einer DNA-Spaltaktivität benötigt das McrBC-Restriktionssystem eine bestimmte Sequenz gleich zweimal in einem linearen DNA-Molekül. Auch viele andere bekannte Proteine mit DNA-bindenden Eigenschaften führen ihre Funktion mit wesentlich verbesserter Effizienz oder sogar ausschließlich aus, wenn sie zugleich an zwei für sie spezifische Sequenzen an der DNA binden können. Dies ist nicht nur bei den in der Einleitung dieser Arbeit detailliert vorgestellten Typ III (und eingeschränkt auch bei Typ I) Restriktions-/Modifikationssystemen der Fall, sondern auch bei Enzymen der Typ II Untergruppe wie *EcoRII* (Krüger *et al.*, 1988), *NaeI* (Conrad & Topal, 1992) und *SfiI* (Wentzell *et al.*, 1995). Auch außerhalb des Reichs der Restriktionsendonukleasen gibt es vergleichbare Beispiele wie die Transkriptionsregulatoren AraC (Dunn *et al.*, 1984) und λ CI (Hochschild *et al.*, 1983) oder Transposasen und Proteine, die an der sequenzspezifischen Rekombination beteiligt sind wie λ Int, Tn3 Resolvase und Mu A Transposase (Boocock *et al.*, 1986; Craigie & Mizuuchi, 1986; Gellert & Nash, 1987; Wang & Giaever, 1988). Dabei ist bei den verschiedenen Systemen die Art und Weise sehr unterschiedlich, wie der gegenseitige Kontakt der an beiden systemspezifischen DNA-Sequenzen gebundenen Proteinkomplexe zustande kommt bzw. der an eine Erkennungssequenz gebundene Proteinkomplex eine zweite systemspezifische Sequenz findet. Eine Möglichkeit einer über lange DNA-Abschnitte hinweg reichenden Interaktion zwischen Proteinkomplexen bzw. DNA-Sequenzen ist das Biegen der DNA bis hin zur Bildung freier DNA-Schleifen (*loops*). Dieser Mechanismus des *looping* wird für viele Typ II Restriktionsenzyme vermutet (Gabbara & Bhagwat, 1992; Topal *et al.*, 1991; Wentzell *et al.*, 1995) wie auch für einige Transkriptionsregulatoren (Dunn *et al.*, 1984; Fickert & Müller-Hill, 1992; Hochschild & Ptashne, 1986; Krämer *et al.*, 1987). Eine Veränderung der eine optimale Interaktionsmöglichkeit bietenden Entfernung der beiden spezifischen DNA-Sequenzen um eine halbe Helixwindung (5 bp) führt bei den nach diesem Modell arbeitenden Proteinsystemen zu einem deutlichen Rückgang der Aktivität, während eine zusätzliche Veränderung der Entfernung in gleicher Richtung diesen Effekt wieder aufzuheben vermag (Schleif, 1992). Dieses Phänomen wird über die damit verbundene Phasenverschiebung erklärt, die zwei an bestimmte DNA-Sequenzen gebundene Proteine auf einer Seite der DNA optimal zusammenführen kann und so eine starke Interaktion ermöglicht. Eine Veränderung der Distanz um eine halbe

Helixwindung bewirkt eine relative Verschiebung der Proteinkomplexe um die Helixachse, was zu einer Beeinträchtigung der Protein-Protein-Interaktion führt. Der *looping* Mechanismus wird vermutlich durch die lokale Erhöhung der Konzentration des betreffenden Proteins ausgelöst und ist daher nicht über eine allzu große Distanz wirksam. Meist beschränkt sich die erfolgreiche Interaktion auf eine Entfernung von maximal etwa 500 bp (Müller-Hill, 1998), selten 800 bis 1000 bp (z. B. bei dem Repressor *deo R*, dem *enhancer* NRI des *E. coli* *glnALG* Operons oder der Restriktionsendonuklease *SfiI*; Reizer & Magasanik, 1986; Amouyal *et al.*, 1989; Wentzell *et al.*, 1995). Für die Restriktionsendonuklease McrBC wurde die Abhängigkeit der DNA-Spaltung von dem Abstand zweier McrBC-Erkennungssequenzen in linearen DNA-Molekülen in jüngster Zeit systematisch untersucht. Dabei konnte ein oben beschriebener phasenabhängiger Effekt jedoch nicht festgestellt werden (Stewart & Raleigh, 1998). Ein solcher Effekt wurde auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bei der Verwendung verschiedener DNA-Substrate nicht beobachtet. Somit ist es als sehr unwahrscheinlich zu betrachten, dass ein an eine spezifische DNA-Sequenz gebundener McrBC-Komplex über zum Teil recht große Distanzen mit einer zweiten McrBC-Erkennungssequenz oder einem zweiten spezifischen McrBC-Komplex durch *looping* der DNA interagiert. Dies gilt mit zwei möglichen Einschränkungen, bei denen zum Einen eine sehr variable Position des DNA hydrolysierenden Bereichs im McrBC-Komplex angenommen werden muss, oder aber eine Bildung ringförmiger Strukturen um die spezifischen Bindungsstellen in der DNA-Sequenz (Stewart & Raleigh, 1998). Da die Resultate der vorliegenden Arbeit eine sehr ausgeprägte Variabilität der von McrBC verwendeten Schnittpositionen in den untersuchten DNA-Substraten zeigen, kann der Mechanismus des DNA-*looping* durch McrBC nicht ausgeschlossen werden.

Da, wie hier gezeigt, die Orientierung der McrBC-Erkennungssequenzen zueinander in Bezug auf die DNA-Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem keine Rolle spielt und auch keine Abhängigkeit der McrBC-Spaltung von der Topologie der Substrat-DNA festgestellt werden konnte (Sutherland *et al.*, 1992; vgl. hierzu jedoch auch Panne *et al.*, 1999), scheint die Art der Interaktion der McrBC-Komplexe miteinander bzw. mit den systemspezifischen DNA-Sequenzen auch anderer Natur zu sein, als es bei sequenzspezifischen Rekombinasen und Transposasen der Fall ist. Bei diesen Enzymen ist die Bildung des reaktiven Komplexes von bestimmten topologischen Voraussetzungen abhängig, z. B. von der Überspiralisierung der DNA und der Möglichkeit, beide Erkennungsstellen in eine bestimmte räumliche Orientierung zueinander bringen zu können. Diese Bedingungen stellen einen *topological filter* dar, anhand dessen relative Orientierung und Nachbarschaft

von zwei Erkennungsstellen vom Enzym erkannt werden können (Craigie & Mizuuchi, 1986; Gellert & Nash, 1987; Benjamin & Cozzarelli, 1990).

Eine weitere Möglichkeit der über lange DNA-Abschnitte hinweg reichenden Interaktion zwischen Proteinkomplexen bzw. DNA-Sequenzen ist die nukleotidabhängige DNA-Translokation, wie sie von den Typ I Restriktionskomplexen durchgeführt wird und wie sie ähnlich auch für den T4-Transkriptions-*Enhancer* gezeigt wurde, wenn auch mit z. T. stark abweichenden Details (Herendeen *et al.*, 1992). Auch von anderen Proteinen, die bei DNA-Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind, ist dieser Mechanismus bekannt (Wang & Giaever, 1988; Dröge, 1994). Die nukleotidabhängige Translokation ist ein aktiver Vorgang, der sich von einem passiven Gleiten (*sliding*) der Proteine auf der DNA unterscheidet. Bei diesem Vorgang wird die DNA durch den an die Erkennungssequenz gebunden bleibenden (z. B. bei Typ I und Typ III Restriktionsenzymen) oder frei beweglichen (z. B. bei Helikasen) Enzymkomplex einseitig oder wie im Falle der Typ I Restriktionssysteme auch beidseitig an den Komplex herangezogen. Die Abschnitte der DNA, die während dieses Vorgangs den ziehenden Teil des Enzymkomplexes passieren sollen, müssen frei zugänglich sein. Besondere DNA-Strukturen oder fest an die DNA gebundene Proteine in dem während der Translokation an den Enzymkomplex heranzuziehenden Abschnitt der DNA können als physikalische Barriere den Enzymkomplex an einem weiteren Translozieren der DNA hindern und die Translokation zum Erliegen bringen. Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, löst ein derartiges Anhalten des Translokationsvorgangs bei Typ I Restriktionsenzymen das Ereignis der DNA-Spaltung aus. Ohne äußere Einflüsse ist die ATP-hydrolyseabhängige DNA-Translokation der Typ I Enzyme sehr prozessiv, so dass diese Systeme ohne weiteres Distanzen von mehreren tausend Basenpaaren durch Translokation überbrücken können (*EcoKI*: bis 11 kbp; Meisel *et al.*, 1992; Studier & Bandyopadhyay, 1988) und so in Wechselwirkung mit weit abgelegenen Translokationsbarrieren treten können. Dieser Punkt macht zweifelhaft, ob das McrBC-System den Mechanismus einer DNA-Translokation anwendet. Für eine erfolgreiche DNA-Spaltung durch dieses System dürfen dessen Erkennungssequenzen nicht beliebig weit voneinander entfernt sein. Die Effizienz der DNA-Spaltung durch McrBC nimmt statistisch oberhalb von 80 bp mit zunehmender Entfernung der beiden Erkennungssequenzen voneinander deutlich ab. Dies zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sowie eine systematische Untersuchung von Stewart & Raleigh (1998). Eine Distanz von mehr als 2000 bp vermag kaum noch DNA-Doppelstrangbrüche durch McrBC auszulösen. Ein weiterer Unterschied zwischen McrBC und den Typ I Restriktionsenzymen ist, dass bei

letzteren nach Bindung des Enzymkomplexes an die DNA der ATP-Umsatz deutlich erhöht wird, während dies bei McrBC mit dem entsprechenden Kofaktor GTP nur im geringen Ausmaße der Fall ist. Diese Befunde kann man dahingehend interpretieren, dass der durch McrBC praktizierte Mechanismus nicht auf einem Translokationsvorgang beruht, oder aber das System eine derartige Translokation durch derzeit nicht bekannte Faktoren oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten spontan beendet. Letzteres wäre gleichbedeutend mit einer geringen Prozessivität des Translokationsvorgangs. Einige Befunde aus jüngster Zeit deuten darauf hin, dass das McrBC-Restriktionssystem tatsächlich den Mechanismus einer aktiven DNA-Translokation anwendet. So beeinflussen an die Substrat-DNA gebundene Lac-Repressorproteine deutlich die Restriktionsaktivität des McrBC-Systems. Dies wurde durch Spaltungsexperimente mit linearen Substratmolekülen gezeigt, die ein McrBC-Erkennungselement bzw. zwei 257 bp voneinander getrennte McrBC-Erkennungselemente enthalten, und zwischen beiden Erkennungssequenzen des McrBC-Systems zwei Bindungsstellen des Lac-Repressorproteins besitzen (lacO1 und lacO3, 94 bzw. 51 bp von den McrBC-Erkennungssequenzen entfernt). Während die McrBC-Spaltung von DNA, die beide McrBC-Erkennungssequenzen besitzt, nicht durch die Bindung der Repressorproteine an deren Bindungsstellen beeinflusst wird, werden Substrate mit nur einer McrBC-Erkennungssequenz (die ansonsten nicht durch McrBC spaltbar sind) in Anwesenheit des Lac-Repressors zu einem geringen Anteil gespalten. Analog zu Typ I Restriktionsenzymen bewirkt die Bindung derartiger Proteine an die Substrat-DNA die Induktion einer Spaltreaktion durch den Enzymkomplex (hier McrBC), die ohne diese Bindung nicht vorhanden ist. Dieser Effekt wird von den Autoren (Panne *et al.*, 1999) wie für Typ I Enzyme dahingehend interpretiert, dass der an die Erkennungssequenz gebundene McrBC-Enzymkomplex durch DNA-Translokation an das DNA-gebundene Protein (hier den Repressor Lac) stößt, was eine Spaltreaktion auslöst. Damit ist für McrBC der Mechanismus der DNA-Translokation als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Ein analoges Experiment wurde unabhängig von den oben geschilderten Untersuchungen auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Hier wurde jedoch durch die Bindung der *EcoRV*-Variante D90A an ein lineares DNA-Substrat, welches zusätzlich zu einer McrBC-Erkennungssequenz eine Bindungsstelle für dieses katalytisch inaktive, aber stark an seine Erkennungssequenz bindende Restriktionsenzym enthält, keine Spaltung der DNA durch das McrBC-System hervorgerufen (vgl. S. 203). Da die Bindung der *EcoRV*-Variante an die Substrat-DNA unter den gegebenen Versuchsbedingungen gezeigt wurde und das Homodimer *EcoRV* als Translokationsbarriere nicht zu klein ist (*EcoRV* besitzt mit ca. 58 kDa ein sogar

um 50 % höheres Molekulargewicht als das Repressorprotein Lac [ca. 38.6 kDa]), begründet sich das Ausbleiben eines derartigen Effekts möglicherweise in den hier verwendeten DNA-Substraten, die mit einer Länge von 157 bp nur gut 7.5 % der Gesamtlänge der von Panne *et al.* (1999) verwendeten DNA besitzen und zudem nur ein McrBC-Erkennungselement enthalten, das aus einer singulären McrBC-Erkennungssequenz besteht. Wie in dieser Arbeit gezeigt, werden solche Sequenzen durch das McrBC-System schlechter gebunden als solche Elemente, die aus zwei McrBC-Erkennungssequenzen bestehen, wie sie in den von Panne *et al.* (1999) verwendeten Substraten vorkommen. Somit spricht das Ausbleiben einer durch *EcoRV* induzierten McrBC-Spaltung in dieser Arbeit nicht unbedingt gegen den Mechanismus einer DNA-Translokation durch McrBC.

Bezüglich Typ I Restriktionsenzymen, aber auch zu Typ III Restriktionsendonukleasen gibt es weiterreichende Ähnlichkeiten des McrBC-Systems, als die oben beschriebene Beeinflussung der Restriktionsaktivität durch die Anzahl der Erkennungssequenzen im DNA-Substrat. Wie das McrBC-System bestehen auch Typ I und Typ III Systeme aus mehreren verschiedenen Untereinheiten (vgl. *Einleitung*), und wie bei diesen ist auch bei McrBC die DNA-Spaltung durch das Enzym abhängig von der Hydrolyse eines Nukleosid-Triphosphats. Analog zu den Typ III Restriktionsenzymen schneidet auch McrBC die DNA nicht innerhalb der Erkennungssequenz, sondern in der Nähe einer von zwei distanzierten Erkennungssequenzen. Damit besteht ein deutlicher Unterschied des McrBC-Systems zu Typ I Restriktionssystemen, die ihre Restriktionsaktivität weit weg von ihrer Erkennungssequenz ausüben können. Trotz vieler Gemeinsamkeiten läßt sich das McrBC-System jedoch keiner der bekannten Typenklassen an Restriktionssystemen zuordnen.

Im Unterschied zu Typ I und Typ III Restriktionsenzymen, in ihrer DNA-Spaltung abhängig von der Hydrolyse von ATP sind, ist McrBC in seiner DNA-Spaltaktivität strikt abhängig von GTP-Hydrolyse (Raleigh, 1992). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Reaktionsmechanismus von McrBC ein anderer ist als bei Typ I und Typ III Enzymen, und/oder der NTP-Kofaktor eine unterschiedliche Rolle spielt: ATP wirkt als Energiequelle für die gerichtete DNA-Translokation durch den Typ I Enzymkomplex, GTP könnte analog zu der Situation bei G-Proteinen der eukaryotischen Signaltransduktionsketten eine regulatorische Funktion besitzen. Dieser Punkt wird im nachfolgenden Kapitel *Restriktion von DNA durch das McrBC-System* näher besprochen.

Im Gegensatz zu Typ I und Typ III Restriktions-/Modifikationssystemen, aber auch zu denen der Typengruppen II und IV, die DNA mit unmethylierten Erkennungssequenzen spalten (bzw. wie Typ III Systeme unmethylierte Erkennungssequenzen in bestimmter Anordnung

methylieren) und (hemi-)methylierte DNA methylieren bzw. ignorieren, ignoriert das McrBC-System unmethylierte DNA und spaltet lediglich spezifisch methylierte Substrate. Dieser Eigenschaft entsprechend besitzt das McrBC-System keine Methyltransferase-Aktivität, McrBC ist also ein reines Restriktionssystem. Damit ist es vergleichbar mit anderen methylierungsabhängigen Restriktionssystemen wie Mrr oder McrA (vgl. *Einleitung*), läßt sich aber aufgrund von Zusammensetzung und genetischer Struktur keinem anderen dieser bekannten Systeme zuordnen. Bezüglich seiner Eigenschaft, mit methylierter DNA zu interagieren und an dieser endonukleolytische Spaltungen zu vollziehen, besteht darüber hinaus eine Analogie zwischen dem McrBC-Restriktionssystem und anderen Enzymsystemen, die keinen Restriktionsphänotyp zeigen, sondern an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind. So führt auch das MutHLS-System, welches mit der Untereinheit MutS Basenfehlpaarungen in der DNA-Doppelhelix erkennen kann, DNA-Spaltungen durch, die von dem Vorhandensein spezifischer Methylierungen in der DNA abhängig sind (Lahue *et al.*, 1989; Jirincy, 1998). Ein ATP-abhängiger DNA-Translokationsmechanismus durch MutS bewirkt die Interaktion des Dimers mit zwei deutlich distanzierten DNA-Sequenzen (Allen *et al.*, 1997; Jirincy, 1998). Die endonukleolytische Untereinheit des am spezifischen DNA-Substrat entstehenden MutHLS-Komplexes, MutH, führt jedoch im Unterschied zum McrBC-System nur die Spaltung eines der beiden DNA-Stränge durch, wobei die Endonukleaseaktivität von MutH durch die ATP-abhängige, mit DNA interagierende Untereinheit MutL stimuliert wird (Ban & Yang, 1998b; Hall & Matson, 1999; Spampinato & Modrich, 2000). Der MutHLS-Komplex und dessen endonukleolytische Einzelstrangspaltung leiten weitere Prozesse ein, die zu einer Reparatur der erkannten Basenfehlpaarung in der DNA führen (Modrich, 1991). Der Vergleich des McrBC-Systems mit MutHLS zeigt Übereinstimmungen beider Systeme, die als Hinweis auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung beider Systeme angesehen werden können (vgl. Kapitel *Evolution des McrBC-Systems*, S. 240).

Aufgrund der Primärstruktur von McrB läßt sich für diese Untereinheit eine gewisse Homologie zu einem anderen Restriktionssystem feststellen. Es handelt sich hierbei um das plasmidcodierte Restriktions-/Modifikationssystem *LlaI* aus *Lactococcus lactis*, dessen Adenin-Methyltransferase *M.LlaI* zwar zu den klassischen Typ II's Methylasen gezählt werden kann (Hill *et al.*, 1991), das ansonsten jedoch Eigenschaften besitzt, die an Typ I Systeme erinnern (O'Sullivan *et al.*, 1995). Die Sequenz des für das *LlaI* R/M-System codierenden Plasmids pTR2030 enthält neben dem *abiA*-Gen, dessen Produkt für die Abwehr von Phageninfektionen wichtig ist, das Gen der *LlaI*-Methyltransferase (*llaIM*) sowie drei

Gene, die für die Restriktionskomponenten *LlaI.1*, *LlaI.2* und *LlaI.3* codieren. Die Abwesenheit der Gene *llaI.2* und/oder *llaI.3* führt zu einem ineffizienten Restriktions-Phänotyp, während die Abwesenheit von *llaI.1* einen vollständigen Verlust der *LlaI*-Restriktionsaktivität bewirkt. Interessanterweise besitzt das 337 Aminosäurereste große Genprodukt *LlaI.2* eine Homologie zu McrB, die ausschließlich auf die GTP-bindende Domäne von McrB beschränkt ist (O'Sullivan *et al.*, 1995). Für das *LlaI*-Restriktionsenzym konnte bisher allerdings keine GTP-Abhängigkeit nachgewiesen werden, so dass McrBC nach wie vor das einzige bekannte Restriktionssystem darstellt, dessen Restriktionsaktivität strikt abhängig von der Hydrolyse von GTP ist.

5. Restriktion von DNA durch das McrBC-System

Der Ablauf der Restriktion von DNA durch das McrBC-System ist bis heute nicht vollständig bekannt. Obwohl (vor allem in den letzten Jahren) eine beachtliche Anzahl von Details über die Eigenschaften dieser einzigartigen Restriktionsendonuklease bekannt wurden, weisen die bisher beschriebenen Modelle zum Ablauf der DNA-Spaltung durch McrBC große Lücken und zum Teil sogar Unstimmigkeiten auf. Wesentliche Fragen zur McrBC-Restriktion von DNA konnten bis heute nicht befriedigend beantwortet werden. So ist beispielsweise unklar, wie die Interaktion der McrBC-Komplexe mit mehreren spezifischen DNA-Sequenzen erfolgt, weshalb die Hydrolyse von GTP für die Hervorbringung der Restriktionsaktivität durch McrBC essenziell ist, wieviele katalytische Zentren im McrBC-Komplex bei der DNA-Spaltung aktiv und wo sie lokalisiert sind und was die eigentliche DNA-Spaltreaktion durch McrBC an so vielen möglichen Positionen im DNA-Substrat auslöst. Zu einigen dieser Punkte gibt es heute konkrete Hinweise, die jedoch nicht ausnahmslos kritiklos zu betrachten sind. Mögliche Mechanismen der Wechselwirkung von McrBC mit mehreren systemspezifischen Erkennungssequenzen, z. B. die Anwendung des Mechanismus aktiver DNA-Translokation oder auch des DNA-*looping* durch das McrBC-System, wurden bereits oben erörtert.

Nur sehr unbefriedigende Kenntnisse gibt es über den Zusammenhang der GTP-Hydrolyse durch McrB und der Restriktionsaktivität durch McrBC. Klar ist, dass weder das Fehlen von GTP noch die alternative Anwesenheit nicht hydrolysierbarer GTP-Analoga zu einer uneingeschränkten Restriktionsaktivität der Nuklease führen (vgl. *Einleitung*). Die Nutzung der bei der GTP-Hydrolyse durch McrB frei werdenden Energie für eine aktive DNA-Translokation durch McrBC ist eine nahe liegende Vermutung (Panne *et al.*, 1999). Dies

würde bedeuten, dass das McrBC-System ein DNA-Motorproteinkomplex ist und in die Gruppe der nukleosid-5'-triphosphathydrolysierenden DNA-Translokatoren (Lohman & Bjornson, 1996; Vale & Milligan, 2000) einzuordnen wäre. Ein als sehr kritisch zu bewertendes Ergebnis einer Studie zur GTP-Abhängigkeit der DNA-Spaltung durch McrBC wurde in jüngster Zeit von Panne *et al.* (1999) veröffentlicht, nachdem eine bestimmte McrB-Variante, für die zwar Bindung von GTP, aber keine GTP-Hydrolyseaktivität gezeigt werden konnte, zum Aufbau DNA-spaltaktiver McrBC-Komplexe beitragen kann. Hierbei handelt es sich um die Variante McrB-P203V (die der in dieser Arbeit verwendeten Nummerierung der Aminosäurereste des McrB-Proteins entsprechende Bezeichnung dieser Variante ist McrB-P209V). Der Befund der Autoren ist, dass McrBC-Komplexe, die aus McrB-P203V gebildet werden, keine DNA-Spaltungen durchführen können, es sei denn, der Abstand der McrBC-Erkennungssequenzen im Substrat beträgt 63 bp. Diese Beobachtung wird von den Autoren so interpretiert, dass die GTP-Hydrolyse nicht für die DNA-Spaltreaktion an sich, sondern für eine durch DNA-Translokation zustandekommende Interaktion zwischen beiden Erkennungssequenzen notwendig ist. Im Falle des 63-bp-Abstandes beider Erkennungssequenzen seien die an diesem Substrat gebundenen McrBC-Komplexe so nahe beinander, dass auch ohne DNA-Translokation eine Interaktion der McrBC-Komplexe möglich ist. Gegen diesen Befund sprechen jedoch zwei Punkte. Erstens führt, wie die Autoren selbst zeigen, auch bei der angeblich GTP-hydrolysedefizienten Variante von McrB ein Austausch des Kofaktors gegen ein nicht hydrolysierbares Analogon von GTP (GTP- γ S) zu einem Unvermögen der daraus entstehenden McrBC-Komplexe, das DNA-Substrat mit dem 63-bp-Abstand der beiden McrBC-Erkennungssequenzen zu spalten. Zweitens konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die besagte McrB-Variante zur GTP-Hydrolyse fähig ist, wenn auch mit einer um ca. 75 % verminderten Rate (Pieper *et al.*, 1999a). Die DNA-Spaltaktivität von McrBC mit dieser Variante ist etwa um dasselbe Ausmaß vermindert wie die GTPase-Aktivität und erzielt ein identisches Muster von Produktbanden nach Spaltung von pBW201 wie McrBC mit der unmodifizierten Wildtyp-Variante von McrB (pers. Mitteilung von U. Pieper, Gießen). Diese Befunde sprechen gegen die mit der entsprechenden Variante erhaltenen Resultate von Panne *et al.* (1999) und deren Interpretation. Auch wenn die stark verminderte GTPase-Aktivität der P209V-Variante von McrB keinen effektiven Translokationsvorgang zu bewirken vermag und keinen Einfluss auf die DNA-Spaltung selbst besitzt, bleibt die Bedeutung der vom McrBC-System durchgeführten GTP-Hydrolyse weitgehend spekulativ (näheres hierzu s. u.).

Alternativ könnte die GTP-Hydrolyse durch McrB eine autoregulatorische Bedeutung haben, ähnlich wie bei monomeren und heterotrimeren G-Proteinen (Bourne *et al.*, 1990; 1991).

Während die Funktion der eukaryotischen G-Proteine als Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden bekannt ist, gibt es keinen Hinweis auf eine solche Funktion von McrBC. Dennoch sprechen einige Befunde dafür, dass sich das McrBC-System, insbesondere die McrB-Untereinheit, von solchen regulatorischen G-Proteinen oder einem gemeinsamen Vorläufer ableitet. Wie erwähnt, besitzt die Untereinheit McrB des McrBC-Restriktionssystems eine pseudoheterodimere Struktur (s. Kapitel *Untereinheiten und Domänen des McrBC-Systems*, S. 211), deren carboxyterminale Domäne typische Sequenzmotive der GTP-bindenden Proteine enthält. Als einzige bekannte Restriktionsendonuklease ist McrBC abhängig von einem GTP-Kofaktor, dessen Funktion nicht durch ATP ersetzt werden kann. Damit unterscheidet sich das McrBC-System deutlich von allen anderen nukleotidabhängigen Restriktionssystemen, die allesamt ATP als essenziell zu hydrolysierenden Kofaktor benötigen. Eine eigenständige phylogenetische Entwicklung der Konsensussequenzen GTP-bindender Proteine in McrB kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber mehr als unwahrscheinlich. Auch die Ableitung der in McrB vorhandenen GTP-Bindungsmotive von vormals ATP-Bindungsmotiven ist prinzipiell denkbar, erscheint jedoch für eine reine Energiegewinnung zur direkten Ausübung motorischer Prozesse ebenfalls wenig wahrscheinlich, da sich ATP als chemischer Energielieferant in mittlerweile unzähligen bekannten enzymatischen Reaktionen bewährt hat, wie beispielsweise bei sog. Zellmotoren (Oosawa, 2000). Die Argumentation, der Typ des zu hydrolysierenden Nukleosidtriphosphats wurde während der Phylogenese des McrBC-Systems zugunsten einer besseren Regulation von ATP zu GTP gewechselt, führt wieder zu den eukaryotischen G-Proteinen, die die Hydrolyse von GTP nicht nur zum Zwecke der Energiegewinnung durchführen, sondern für regulatorische Prozesse. Viele Argumente, nicht nur die Frage nach der Notwendigkeit einer solch aufwendigen und zudem noch energieverbrauchenden Regulation einer Restriktionsendonuklease (die in ihrer Restriktionsaktivität darüber hinaus zusätzlich noch durch McrB_s moduliert werden soll, vgl. Kapitel *Untereinheiten und Domänen des McrBC-Systems*, S. 211), lassen einen Zusammenhang von McrB mit typischen G-Proteinen zwar zweifelhaft erscheinen, dennoch sollte diese Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden.

Der dritte Punkt der wichtigen offenen Fragen betrifft das aktive Zentrum des McrBC-Komplexes, das die DNA-Spaltung katalysiert. Es ist derzeit nicht bekannt, wieviele solcher Zentren in einem DNA-spaltaktiven McrBC-Komplex vorhanden sind und welche von diesen sich an der Erzeugung eines DNA-Doppelstrangbruchs beteiligen. Auch die Lokalisation von DNA-Spaltung katalysierender aktiver Zentren im McrBC-Komplex ist nicht bekannt. Hierzu gibt es jedoch zwei wichtige Hinweise. In der Primärstruktur der Untereinheit McrC befindet

sich die Sequenzabfolge TD_x₁₂DAK, die dem in Restriktionsenzymen konservierten katalytischen Motiv PD_x₁₀₋₃₀(D/E)_xK sehr ähnlich ist. Zudem zeigen jüngste Untersuchungen, dass dieses Sequenzmotiv möglicherweise an der Hydrolysereaktion des Zuckerphosphatrückgrats der DNA durch das McrBC-System beteiligt ist (vgl. Kapitel *McrC*, S. 25). Diesen Daten steht entgegen, dass in der Literatur McrBC-typische DNA-Spaltungen beschrieben wurden, die auch ohne die Anwesenheit der Untereinheit McrC erfolgten (s. *Einleitung*). Die nähere Analyse dieser Beschreibungen favorisiert jedoch die Annahme, dass in der McrC-Untereinheit ein aktives Zentrum zur Katalyse der DNA-Spaltung durch McrBC lokalisiert ist. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die McrC-Untereinheit selbst keine spezifischen DNA-Bindungseigenschaften besitzt. Davon ausgehend, dass McrC tatsächlich ein katalytisches Zentrum für die Spaltung von DNA besitzt, besteht hier eine Analogie zu der katalytischen Untereinheit der Typ I Restriktionsenzyme. Die HsdR-Untereinheit besitzt ebenfalls keine sequenzspezifischen DNA-Bindungseigenschaften, aber ein katalytisches Zentrum für die Durchführung einer DNA-Spaltreaktion (s. *Einleitung*). Während die meisten bekannten Restriktionsenzyme zwei aktive Zentren besitzen, die gemeinsam durch Spaltung jeweils eines DNA-Stranges einen Doppelstrangbruch in der Substrat-DNA erzeugen, ist HsdR ein Beispiel dafür, dass von einem Enzym auch ein singulär vorhandenes aktives Zentrum zur Durchspaltung eines DNA-Doppelstranges verwendet werden kann. Dies ist möglich, in dem das singuläre Zentrum nacheinander an beiden Spaltstellen wirksam wird. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass, wie in der *Einleitung* dieser Arbeit beschrieben, Typ I Restriktionsenzyme zwar zwei HsdR-Untereinheiten und somit zwei aktive Zentren besitzen, diese aber völlig unabhängig voneinander an anderen Abschnitten der Substrat-DNA agieren. Andere ebenfalls zur Durchspaltung doppelsträngiger DNA fähige Enzyme, die als Monomer vorliegen, besitzen intramolekular entweder zwei katalytische Zentren, wie die *homing*-Endonuklease PI-*SceI* aus Hefe (Christ *et al.*, 1999), oder dimerisieren zur Durchführung der Katalyse-Reaktion, wie z. B. *FokI* (Bitinaite *et al.*, 1998; Wah *et al.*, 1998). Welche der beschriebenen Möglichkeiten im McrBC-Restriktionssystem verwirklicht ist oder ob das System bei der Durchführung der DNA-Spaltung eine komplett andere Strategie verfolgt, kann derzeit noch nicht sicher beantwortet werden. Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit mit zirkulären Plasmid-Substraten durchgeführten Spaltungskinetiken mit dem McrBC-System zeigen, dass bei der Spaltung überspiralisierten (*supercoiled*) Plasmids keine offenzirkuläre (*open circle*) Zwischenform akkumuliert wird. Dies zeigen auch jüngste Resultate von Panne *et al.* (1999). Das bedeutet, dass die zwei zu einem DNA-Doppelstrangbruch führenden Spaltungen der beiden einzelnen Stränge der Substrat-DNA

durch das McrBC-System konzertiert erfolgen. Dabei stehen, wie hier gezeigt wurde, die Spaltungsereignisse in den beiden Strängen in keiner definierten räumlichen Abhängigkeit zueinander. Dieses Phänomen macht eine Durchspaltung des DNA-Doppelstrangs unwahrscheinlich, die auf die Aktivität eines singulär vorhandenen katalytischen Zentrums zurückzuführen ist. Für einen solchen Fall ist zu erwarten, dass die zweite vom katalytischen Zentrum durchgeführte Spaltreaktion nicht in einer beliebigen oder zufälligen, sondern stets in gleicher Weise nach der zuerst durchgeführten Spaltreaktion im anderen Strang erfolgt. Zeitlich voneinander abhängige, aber räumlich voneinander weitgehend unabhängige Spaltungsereignisse in beiden DNA-Strängen sind am ehesten erklärbar durch getrennte, also in Mehrzahl vorliegende katalytische Zentren, deren Position und Aktivität durch die komplexe und, wie gezeigt, variable Assemblierung der Untereinheiten des McrBC-Systems an systemspezifischen Sequenzen moduliert wird.

Der letzte Punkt der eingangs zu diesem Kapitel genannten wichtigen offenen Fragen (aber damit bei weitem nicht die letzte wichtige unbeantwortete Frage) betrifft den Auslöser des DNA-Spaltungsereignisses durch McrBC. Während für viele Restriktionsendonukleasen, z. B. Typ II Enzyme, schon das Vorfinden der jeweiligen Erkennungssequenz ausreichend ist, um die DNA-Spaltung auszuführen, benötigen andere Restriktionssysteme hierfür einen zusätzlichen Auslöser von außen. Dies wurde z. B. für Typ I Restriktionsendonukleasen gezeigt, die erst durch eine externe Behinderung der von diesen Enzymen durchgeführten DNA-Translokation mit der Erzeugung eines Doppelstrangbruchs reagieren (vgl. *Einleitung*). Für das McrBC-System kann ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden. Dies zeigen Daten, nach denen das McrBC-System lineare DNA-Substrate mit nur einer McrBC-Erkennungssequenz nicht spalten kann, aber eine DNA-Spaltung durch ein etwas entfernt von dieser spezifischen Sequenz an das DNA-Substrat gebundenes Lac-Repressorprotein induziert werden kann (vgl. S. 228). Einen noch deutlicheren Hinweis ergaben Experimente, bei denen zirkulär geschlossene DNA, die nur ein singuläres McrBC-Erkennungselement enthält, als Substrat für Spaltungsversuche mit der McrBC-Restriktionsendonuklease eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu der entsprechenden linearen DNA, die kein Spaltsubstrat für das McrBC-System darstellt, ist die zirkuläre Form durch McrBC spaltbar (Panne *et al.*, 1999). Da dieser Effekt nur bei negativ überspiralisierten Plasmiden und nicht bei offenzirkulären Formen beobachtet wurde, könnte die durch die DNA-Translokation des an die Erkennungssequenz gebunden bleibenden McrBC-Komplexes bewirkte Änderung der DNA-Topologie der Auslöser der DNA-Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem sein. Somit würde analog zu Typ I Restriktionsenzymen allgemein eine Hinderung der durch McrBC durchgeführten

DNA-Translokation, wie in diesem Falle durch die translokationsinduzierte Topologieänderung der DNA, die Erzeugung eines Doppelstrangbruchs durch die Endonuklease auslösen. Ergänzend muss hier allerdings hinzugefügt werden, dass diese Interpretation nicht vereinbar ist mit den Resultaten älterer Untersuchungen der durch McrBC verursachten DNA-Spaltung in Abhängigkeit von der Topologie des Substrates (Sutherland *et al.*, 1992).

5.1. DNA-Spaltung durch McrBC: ein neues Modell

An dieser Stelle soll der Ablauf der DNA-Spaltung durch die Restriktionsendonuklease McrBC unter Einbeziehung aller bisher bekannten Details über das System und seine Wirkungsweise in einem Modell zusammengefasst werden. Folgende stichpunktartig aufgeführten Punkte, die über das McrBC-System bekannt sind oder als sehr wahrscheinlich angesehen werden und in dieser Arbeit besprochen wurden, sowie weitere Details, die an entsprechender Stelle erwähnt werden, werden dabei als gegeben angesehen und sollen entsprechend berücksichtigt werden.

1. Die Untereinheit McrB ist ein Pseudoheterodimer, bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer GTP-Bindungs- und Hydrolysedomäne (vgl. S. 213).
2. McrB, wie auch McrB_s, besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität (vgl. S. 23).
3. Nur die DNA-Bindungsdomäne von McrB besitzt die Fähigkeit, die systemspezifische DNA-Sequenz zu erkennen und an sie zu binden (vgl. S. 213).
4. Die DNA-Bindungsdomäne von McrB alleine bildet keine Homodimere oder -oligomere an systemspezifischer DNA. Ihr fehlt die Fähigkeit einer Protein-Protein-Wechselwirkung und bindet daher im Verhältnis 1 : 1 an eine Erkennungssequenz (vgl. S. 214).
5. Im Unterschied zur isolierten DNA-Bindungsdomäne vermag die vollständige Untereinheit McrB Homooligomere an systemspezifischer DNA zu bilden (vgl. S. 214).
6. Homooligomere von McrB, die an getrennten, aber nicht weit voneinander distanzierten Erkennungssequenzen gebunden sind, beeinflussen sich gegenseitig bei der Oligomerisierung an spezifischer DNA (vgl. S. 214).
7. Die Bildung der Homooligomere von McrB an systemspezifischer DNA wird durch den Kofaktor GTP moduliert (vgl. S. 216), wobei nur unter GTP-Hydrolyse der Aufbau funktioneller Komplexe möglich ist (vgl. S. 217).

8. Zusammen mit der Untereinheit McrC werden die DNA-gebundenen Komplexe sehr groß und binden auch an unspezifische DNA-Sequenzen (vgl. S. 217).
9. Die Bildung von Komplexen, die beide Untereinheiten McrB und McrC umfassen, geschieht nicht ohne DNA (Sutherland *et al.*, 1992).
10. Der Aufbau der McrBC-Komplexe ist abhängig von der Anzahl und Verteilung von McrBC-Erkennungssequenzen in der jeweiligen Substrat-DNA und ist damit variabel und individuell (vgl. S. 214).
11. Die Spaltung von DNA durch McrBC wird durch die Untereinheit McrC katalysiert (vgl. S. 234).
12. Für eine Spaltung von DNA muss der Kofaktor GTP hydrolysiert werden und zwar mehr als ein GTP-Molekül pro Spaltungsereignis (vgl. Kapitel *GTP-Abhängigkeit der DNA-Spaltung durch McrBC*, S. 31).
13. An systemspezifische DNA-Sequenzen gebundene McrBC-Komplexe bewegen DNA durch den Mechanismus einer Translokation, allerdings mit schwacher Prozessivität (vgl. S. 228).
14. Die essenzielle GTP-Hydrolyse hängt mit der DNA-Bewegung zusammen und nicht mit der DNA-Spaltreaktion an sich, aber letztere ist abhängig von einer vorausgehenden DNA-Bewegung (vgl. S. 232).
15. Die DNA-Spaltung wird ausgelöst durch Arretierung der DNA-Bewegung bei sich weiter fortsetzender GTP-Hydrolyse (vgl. S. 235).
16. Die DNA-Spaltung erfolgt durch mindestens zwei katalytische Zentren, also durch mindestens zwei McrC-Untereinheiten, die sich nicht in ihrer Position, aber in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen und den Doppelstrang der Substrat-DNA konzertiert spalten (vgl. S. 235).
17. Die Position der DNA-Spaltung ist weitgehend unabhängig von der lokalen Sequenz der DNA (vgl. S. 223).
18. Trotz der Variabilität des Aufbaus der McrBC-Komplexe sind die präferierten Spaltstellen jeweils eine komplette Helixwindung der Substrat-DNA voneinander getrennt, aber nicht beliebig weit von der McrBC-Erkennungssequenz entfernt (vgl. S. 224).
19. Nach einem erzeugten DNA-Doppelstrangbruch in der Nähe einer Erkennungssequenz kann der McrBC-Komplex keine weiteren Spaltungsereignisse in der Nähe der zweiten Erkennungssequenz ausführen (vgl. S. 30).

20. Nach einem erzeugten DNA-Doppelstrangbruch bleiben zumindest Teile des McrBC-Komplexes mit mindestens einem der beiden erzeugten DNA-Fragmente verbunden (vgl. S. 218).

Der Ablauf der DNA-Restriktion durch das McrBC-System kann unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte wie nachfolgend dargestellt beschrieben werden, wobei die Richtigkeit einiger Details dieses Modells noch gezeigt werden muss. Das nachfolgend beschriebene Modell basiert auf den in dieser Arbeit begründeten Annahmen, dass die Funktion der GTPase in McrB eher eine regulatorische ist als eine motorische (vgl. S. 233), und dass nur durch Hydrolyse des Kofaktors GTP (und nicht nur lediglich durch dessen Bindung) durch die McrB-Untereinheiten DNA-spaltaktive McrBC-Komplexe aufgebaut werden können (vgl. S. 217). Durch diese Annahmen unterscheidet sich das hier präsentierte Modell grundlegend von den bisher publizierten Vorstellungen des Ablaufs der DNA-Spaltung durch das McrBC-Restriktionssystem.

Die Untereinheiten McrB und McrC liegen zunächst unabhängig voneinander frei in Lösung vor. Bei Gegenwart von DNA, die systemspezifische Sequenzen besitzt, bindet eine McrB-Untereinheit an eine McrBC-Erkennungssequenz bzw. mehrere McrB-Untereinheiten an mehrere Erkennungssequenzen. Dies bewirkt in Gegenwart des Kofaktors GTP und dessen Hydrolyse eine Konformationsänderung dieser Untereinheiten, so dass sich weitere McrB-Untereinheiten an die bereits gebundenen McrB-Proteine anlagern können. Vorstellbar ist die Ausbildung einer auch von anderen Proteinen bekannten Spiral- oder Ringstruktur durch die oligomerisierenden McrB-Untereinheiten, ähnlich wie z. B. bei der RuvB-Untereinheit des bei DNA-Rekombinationsprozessen aktiven RuvABC-Systems, die miteinander wechselwirkende hexamere Ringe bildet (Mitchell & West, 1994; Stasiak *et al.*, 1994). Die Ausbildung einer derartigen Struktur könnte die breitgefächerte Substratazeptanz durch McrBC bezüglich Anzahl, Lage und Orientierung der McrBC-Erkennungssequenzen in einem Erkennungselement der Substrat-DNA erklären. Dabei vermögen die komplexgebundenen McrB-Untereinheiten unspezifische DNA-Kontakte aufzubauen, die freie McrB-Untereinheiten nicht ausbilden können (dies wird durch die Resultate sog. *footprint*-Experimente von Stewart *et al.* [2000] bestätigt, die auf McrB-Kontakte an unspezifischen DNA-Sequenzen zwischen zwei McrBC-Erkennungselementen hinweisen). Die Integration von McrC-Untereinheiten in den DNA-McrB-Komplex ermöglicht die weitere spezifische Aggregation von McrB- und McrC-Untereinheiten. Dabei bewirkt die Untereinheit McrB, die durch die Bindung von GTP in einer passiven Zustandsform vorliegt, eine durch die

Hydrolyse von GTP aktivierte Translokationsbewegung des Komplexes. Wahrscheinlich findet eine Translokation der DNA durch McrBC ausgehend von der Bindungsstelle in beiden Richtungen statt. Die Translokation der DNA geschieht wahrscheinlich nicht durch McrB, sondern durch Zusammenspiel zweier (oder mehrerer) um die DNA-Helix verteilter McrC-Untereinheiten durch zyklisches Ziehen, Loslassen und erneutes Greifen der DNA. Eine McrC-Untereinheit greift die DNA dabei jeweils nach einer Helixwindung an einer relativ identischen Position ohne Ausbildung spezifischer Kontakte zu den Basen des DNA-Substrats. Dieser Mechanismus besitzt nur eine geringe Prozessivität. Die Hydrolyse von GTP liefert nach diesem Modell nicht direkt die Energie für einen Bewegungsvorgang wie die Hydrolyse von ATP bei den oben beschriebenen Motorproteinen (vgl. S. 232), sondern ist, ähnlich wie bei den ebenfalls oben beschriebenen G-Proteinen der Signaltransduktionsketten, Bestandteil eines zyklischen Aktivierungs-/Deaktivierungsvorgangs. Aus diesem Grund wird in dem hier beschriebenen Modell die Durchführung der DNA-Translokationsbewegung durch die Untereinheit McrC favorisiert. In Anlehnung an Typ I Restriktionsendonukleasen werden auch hier die Funktionen der DNA-Translokation und der DNA-Spaltung, die beide durch unspezifische DNA-Kontakte erzielt werden, der gleichen Untereinheit zugeschrieben, wobei die Sequenzspezifität jeweils durch eine andere Untereinheit erzielt wird (bei McrBC speziell durch die aminoternale Domäne von McrB). Im Unterschied zu Typ I Restriktionsenzymen (und auch zu Typ III Enzymen), die vermutlich eine DNA-Translokation nach dem Helikase-Mechanismus betreiben, wird in dem oben beschriebenen Modell der Funktionsweise von McrBC nicht davon ausgegangen, dass die für die Ausübung des Translokationsvorgangs notwendigen Konformationsänderungen der Untereinheit direkt durch die Hydrolyse des Nukleosidtriphosphat-Kofaktors verursacht wird (weder die Untereinheit McrB noch die Untereinheit McrC besitzt die typischen konservierten Domänen der Helikase-Superfamilie II). Vielmehr wird die translozierende Konformationsänderung in McrC indirekt durch entsprechende Änderungen in der regulatorischen Untereinheit McrB induziert. Während jedoch die "klassischen" G-Proteine durch die Bindung von GTP aktiviert werden, in dieser Form ihren Effektor beeinflussen (je nach G-Protein in stimulatorischer oder inhibitorischer Weise) und sich nach erfolgter GTP-Hydrolyse in der passiven Zustandsform von ihrem beeinflussten Effektor trennen (Cassel & Selinger, 1978; Kleuss *et al.*, 1994; Rens-Domiano & Hamm, 1995), ist für das McrBC-System eine etwas andere Situation anzunehmen. Hier stellt der [McrB·GTP]-Komplex keine aktivierte Zustandsform dar, sondern die Aktivierung der McrC-Untereinheit erfolgt erst durch die Hydrolyse des Kofaktors GTP durch McrB. Hierdurch aktiviert, agiert die McrC-Untereinheit als DNA-

Translokator oder, stimuliert durch zusätzliche Faktoren, als unspezifische Endonuklease (s. u.). Für eine erneute Aktivierung der Translokation durch McrC muss das nach der GTP-Hydrolyse an McrB gebundene GDP von der McrB-Untereinheit abdissoziieren und durch Bindung von GTP ersetzt werden. Dieser Zyklus erfolgt durch die niedrige Affinität der McrB-Untereinheit zu GDP, durch deren hohe Affinität zu GTP sowie durch deren intrinsische GTPase, auch ohne zusätzliche Stimulation von außen, wird aber in seinem Ablauf durch die Interaktion der McrB-Untereinheit mit McrC bzw. mit spezifisch modifizierter DNA beschleunigt. Kann die im spezifischen McrBC-Komplex translozierende McrC-Untereinheit trotz erfolgter GTP-Hydrolyse durch die stimulatorische McrB-Untereinheit keine weitere DNA-Translokationsbewegung durchführen, bewirkt dies die Stimulation der unspezifischen Endonukleaseaktivität des McrBC-Komplexes, die durch in der Nähe der Erkennungssequenz lokalisierte McrC-Untereinheiten direkt aufeinanderfolgend in beiden Einzelsträngen der doppelsträngigen Substrat-DNA ausgeführt wird. Dieses Charakteristikum der McrBC-Restriktionsendonuklease, dass der durch den Enzymkomplex erzeugte Doppelstrangbruch der Substrat-DNA immer zwischen zwei Erkennungssequenzen in der Nähe einer Erkennungssequenz erfolgt, begründet sich möglicherweise durch einen zu den Typ III Restriktionsenzymen analogen Mechanismus, die dieses Verhalten ebenfalls zeigen (s. S. 10). Die Initiation der DNA-Spaltung wird durch eine mechanische Sperre an oder durch die DNA hervorgerufen, die das Fortschreiten der DNA-Translokation durch McrBC verhindert, wie beispielsweise das Zusammentreffen mit einem zweiten McrBC-Komplex, das Erreichen eines fest an die DNA gebundenen Proteins oder einer bestimmten DNA-Topologie. Die Unterbrechung der GTP-Hydrolysereaktion bewirkt nach diesem Modell das Ausbleiben der McrC-Aktivierung, wodurch es weder zu einer weiteren DNA-Translokation noch zu einer DNA-Spaltung durch diese Untereinheit kommt. Nach erfolgter Durchspaltung der Substrat-DNA in der Nähe der Erkennungssequenz zerfällt der McrBC-Komplex. Wurde die DNA-Spaltung durch einen zweiten McrBC-Enzymkomplex induziert, bleibt der Komplex, der keine DNA-Spaltung erzielt hat, an der Erkennungssequenz zunächst erhalten, was eine weitere Interaktion dieses Komplexes mit einer DNA-Translokationsbarriere auf der anderen Seite des Komplexes ermöglicht.

6. Evolution des McrBC-Systems

Das McrBC-System zeigt in *Escherichia coli* den Phänotyp einer Restriktionsendonuklease. In seiner Eigenschaft als Restriktionsenzym besitzt das komplexe System in vielerlei Hinsicht

Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Restriktionssystemen, z. B. Typ I und Typ III R/M-Systemen. Obwohl sich der von den genannten enzymatischen Systemen jeweils verfolgte Mechanismus im Detail unterscheidet, wurden für diese Systeme Modelle entwickelt, die die Restriktion der DNA nach Bindung der Komplexe an distanzierte DNA-Sequenzen, DNA-Translokation und Kollision dieser Komplexe beschreiben. Ohne Zweifel entwickelten sich diese Systeme in einer konvergenten Evolution, da sie gleiche Funktionen besitzen: die Erkennung und Inaktivierung (Zerstörung) wirtsfremder DNA, die in die Bakterienzelle eindringt. Da zwischen den Restriktions-/Modifikationssystemen und der methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease McrBC deutliche Unterschiede genetischer, struktureller und funktioneller Art bestehen, ist nicht davon auszugehen, dass sich diese Systeme divergent, also aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Es stellt sich die Frage, welchen phylogenetischen Ursprung das komplexe Restriktionssystem McrBC besitzt. Zu dieser Frage sind drei mögliche Antworten vorstellbar: 1. Das McrBC-System entwickelte sich in der Evolution als reines Restriktionsenzym bzw. leitet sich aus einem reinen Restriktionsenzym ab. 2. Das McrBC-System ist ein Derivat eines Systems mit anderer Funktion und adaptierte im Verlauf der Phylogenese den Restriktionsphänotyp. 3. Das McrBC-System entwickelte sich aus Teilen zweier oder mehrerer Vorläufersysteme, deren Interaktion sich im Verlauf der Phylogenese zum Restriktionsphänotyp entwickelte. Mit dem heutigen Wissensstand über das McrBC-System kann die Frage nicht beantwortet werden. Es existieren allerdings eine Reihe von Hinweisen darauf, dass das McrBC-System von anderen Systemen abstammt.

Möglicherweise stammt das McrBC-System von einem System ab, das bei DNA-Rekombinations- oder DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist. Darauf deuten funktionelle Ähnlichkeiten von McrBC mit dem MutHLS-System (vgl. S. 230) hin. Dabei ist, unter Einbeziehung des oben beschriebenen Modells zur DNA-Restriktion durch McrBC (s. S. 236), die Untereinheit MutL des MutHLS-Systems mit McrB vergleichbar sowie die Untereinheit MutH mit McrC. Das Protein MutL ist eine ATPase, kann also analog zu McrB ein Nukleosid-5'-triphosphat hydrolysieren. Dabei gehört es, wie wahrscheinlich auch McrB, nicht zu den sog. Motorproteinen (vgl. S. 232), sondern zu einer Gruppe von Proteinen, welche die Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzen, um eine Konformationsänderung anderer DNA-Bindungsproteine zu induzieren (Sancar & Hearst, 1993). MutL besitzt weiterhin die Fähigkeit, an DNA zu binden, wobei die DNA-Bindung durch MutL die ATPase-Aktivität des Proteins beeinflusst. Wie die GTPase McrB scheint auch die ATPase MutL ein NTP-aktiviertes Signalmolekül zu sein (Yang, 2000). Der Aufbau der aktiven MutHLS-Komplexe

ist dabei abhängig von der ATP-Bindung und -Hydrolyse durch MutL (der Aufbau funktioneller McrBC-Komplexe ist abhängig von der GTP-Hydrolyse durch McrB; s. o.) und der daraus resultierenden Wechselwirkung mit MutS (welches als Dimer an eine Basenfehlpaarung in der DNA-Doppelhelix gebunden ist) und MutH, dessen Endonukleaseaktivität durch MutL aktiviert wird (Ban & Yang, 1998a; Spampinato & Modrich, 2000). Die Untereinheit MutH besitzt, analog zu McrC, nur ein katalytisches Zentrum und spaltet den DNA-Doppelstrang nur in einem Strang, wie es das oben beschriebene Modell auch für McrC beschreibt. Analog zum McrBC-System erfolgt die Spaltung des DNA-Stranges durch MutH in der Nähe der Erkennungssequenz (Ban & Yang, 1998b), die im Falle des MutHLS-Systems einer durch die Adenin-N⁶-Methyltransferase Dam modifizierten Sequenz entspricht (5'-G^mATC-3'). MutH bzw. das MutHLS-System spaltet jedoch nur den unmethylierten Strang hemimethylierter DNA (Lahue *et al.*, 1989; Modrich, 1991), während im Unterschied dazu das McrBC-System als Restriktionsendonuklease beide DNA-Stränge zu spalten vermag.

Die phylogenetische Ableitung eines funktionellen Analogons von MutH zu McrC ist also ebenso denkbar wie die von MutL zu McrB. Möglicherweise entspricht der MutL-analoge Vorläufer sogar nur dem heute noch von *E. coli* separat translatierten Teilprotein McrB_s. Hier könnte eine Insertion in den Beginn des für McrB_s codierenden Gens (oder umgekehrt, die Insertion der für McrB_s und McrC codierenden Gene in ein anderes offenes Leseraster) die Spezifität des Systems und somit dessen Funktion verändert haben. Dies würde bedeuten, dass der Teil des *mcrB*-Gens, der für die aminoternale Domäne der McrB-Untereinheit codiert, einen anderen Ursprung hat als die Gene von McrB_s und McrC. Da die aminoternale Domäne von McrB spezifisch methylierte DNA erkennt und bindet, liegt eine phylogenetische Abstammung dieser Domäne von einem DNA-bindenden Protein nahe. Interessanterweise zeigt die Struktur des *mcrBC*-Operons, das für das McrBC-System codiert, einige Auffälligkeiten, die eine Abstammung dieses Systems von einem anderen, nicht identifizierten Organismus wahrscheinlich machen. Hierzu gehören der in der Einleitung dieser Arbeit beschriebene (G + C)-Gehalt der *mcrBC*-Gene, der für *E. coli* ungewöhnlich niedrig ist, sowie die sich direkt an diese Gene anschließenden (G + C)-reichen potenziellen Transkriptionsterminatoren. So ist denkbar, dass die erfolgte Insertion der *mcrBC*-Gene in das Genom von *E. coli* und die daraus entstandene Restriktionsaktivität den Bakterien einen zusätzlichen Schutz vor Phagen erbrachte, die durch die Selektionswirkung "herkömmlicher" Restriktionsendonukleasen (die auf Restriktion nicht methylierter DNA spezialisiert sind) Methylmodifikationen in ihrem Genom etablierten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

McrBC ist ein in *Escherichia coli* K-12 vorkommendes multimeres Enzym, welches die Spaltung bestimmter methylierter DNA katalysiert. Von den derzeit rund 3500 bekannten Restriktionsenzymen stellt das McrBC-System die einzige Restriktionsendonuklease dar, deren DNA-spaltende Aktivität obligat von der Hydrolyse von GTP abhängig ist. McrBC läßt sich nicht in das gängige Klassifizierungsschema von Restriktionsendonukleasen einordnen und erweitert das bekannte Funktionsspektrum von GTPasen um den Aspekt der Interaktion mit DNA. Die GTPase-Funktion des McrBC-Systems ist in einer von zwei Domänen der Untereinheit McrB lokalisiert, die auch *in vivo* als verkürzte Variante (McrB_s) durch Verwendung eines alternativen Translationsstarts des *mcrB*-Gens entsteht. Durch die bei McrB_s fehlende aminoternale Domäne des vollständigen McrB-Proteins wird die DNA-Sequenzspezifität des Restriktionssystems bestimmt. Die Untereinheit McrC stellt wahrscheinlich die Endonuklease des Systems dar. Für eine DNA-Spaltung *in vitro* werden nur die Untereinheiten McrB und McrC benötigt, aber nicht McrB_s, welchem wahrscheinlich eine regulatorische Funktion zukommt. An DNA-Sequenzen der Form 5'-R^mC-3' (mit ^mC = 5-Methylcytosin, 5-Hydroxymethylcytosin oder N⁴-Methylcytosin) bilden McrB und McrC höhermolekulare Komplexe, die die DNA zu spalten vermögen, wenn bestimmte Voraussetzungen gegeben sind. Hierzu gehören neben bestimmten Milieubedingungen, die die Anwesenheit der beiden essenziellen Kofaktoren Mg²⁺-Ionen und GTP umfassen, besondere Eigenschaften der DNA, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Im experimentellen Teil dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung der Untereinheiten McrB und McrC sowie Varianten von McrB, die in *in-vitro*-Experimenten eingesetzt wurden, die hauptsächlich der Untersuchung der DNA-Bindung und -Spaltung verschiedener DNA-Substrate durch das McrBC-System dienten. Unter Anwendung verschiedener Methoden wurden eine Reihe von Ergebnissen erzielt, die DNA-spaltaktive McrBC-Komplexe als eine recht dynamische Struktur zeigen. Im Einzelnen lassen die Resultate der vorliegenden Arbeit folgende Aussagen zu:

- Die systemspezifische Erkennungssequenz von McrBC lautet 5'-R^mC-3'. Eine singuläre Sequenz dieser Art reicht für die Entstehung spezifischer Bindungsereignisse durch McrB aus. Sequenzen der Art 5'-RC-3' oder 5'-Y^mC-3' haben keinen Einfluss auf die DNA-Spaltung durch McrBC.

- Die spezifischen DNA-Bindungseigenschaften des McrBC-Systems sind in der aminoterminalen Domäne von McrB lokalisiert. Diese interagiert als eigenständiges Protein (McrB₁₋₁₆₂) nicht mit ihresgleichen und bindet im Verhältnis 1 : 1 an die Erkennungssequenz. Auch die Bindung an nah benachbarte Erkennungssequenzen erfolgt unabhängig voneinander.
- Das Protein McrB vollständiger Länge ist ein Pseudoheterodimer und bildet an spezifischen DNA-Sequenzen oligomere Proteinkomplexe, wobei die Wechselwirkung zwischen McrB-Untereinheiten wahrscheinlich über die carboxyterminale Domäne der Proteine erfolgt. Die beiden Kofaktoren, Mg²⁺-Ionen und GTP, modulieren die Oligomerisierung von McrB. Ohne die Kofaktoren werden keine funktionellen McrBC-Komplexe gebildet.
- Die Anzahl spezifischer Sequenzen sowie deren Abstand im DNA-Substrat hat, im Unterschied zu deren Orientierung, sowohl deutlichen Einfluss auf den Aufbau von McrB-Komplexen an der DNA als auch auf die Effizienz der DNA-Spaltung durch McrBC. Beide Effekte werden sowohl durch eine Erhöhung der Anzahl von McrBC-Erkennungssequenzen im DNA-Substrat als auch durch Verringerung deren Abstände zueinander verstärkt. Bezüglich der DNA-Spaltung gibt es einen optimalen Abstandsbereich zweier 5'-R^mC-3'-Sequenzen von ungefähr 40 bis 100 bp. Mit zunehmender Abweichung von diesem Bereich in Richtung größerer Abstände nimmt die Spaltungseffizienz durch McrBC langsam, in Richtung kleinerer Abstände sehr schnell ab.
- Die Häufigkeit der durch McrBC erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche zwischen zwei Erkennungssequenzen wird durch die zusätzliche Anwesenheit einer oder mehrerer Erkennungssequenzen im gleichen DNA-Molekül in deren Nähe deutlich erhöht, dabei verschiebt sich die statistische Verteilung der McrBC-Spaltungen in Richtung der zusätzlichen Sequenzen. Einen ähnlichen Effekt können auch unmethylierte Sequenzen verursachen, die einen nur wenige Basenpaare langen Abstand einer Erkennungssequenz zum Ende eines linearen DNA-Substrats vergrößern.
- Eine allosterische Aktivierung der DNA-Spaltung durch McrBC durch die Anwesenheit zusätzlicher Erkennungssequenzen in anderen DNA-Molekülen findet nicht statt.
- McrBC vermag geeignete DNA-Substrate an mehreren Stellen zwischen zwei Erkennungssequenzen durchzuspalten, wobei der Enzymkomplex jeweils nur eine Durchspaltung in der Nähe einer der beiden Erkennungssequenzen verursacht. Die bei einem Doppelstrangbruch in den beiden DNA-Strängen durch McrBC verursachten

Spaltungen sind dabei in ihrer Position unabhängig voneinander, McrBC verursacht also kein spezifisches Muster von Überhängen bei der Spaltung von doppelsträngiger DNA.

- In den Abschnitten zwischen zwei Erkennungssequenzen, wo durch das McrBC-System DNA-Spaltungen verursacht werden, besitzt das McrBC-System innerhalb der einzelnen DNA-Stränge mehrere sehr deutlich bevorzugte Schnittpositionen. Diese stehen in keinem festen Entfernungsverhältnis zu einer oder zu beiden Erkennungssequenzen und sind unabhängig von der lokalen Sequenz der DNA, sind aber untereinander periodisch durch 10 bis 11 bp getrennt. Die Übereinstimmung dieses Abstands mit einer kompletten Umwindung der B-DNA-Doppelhelix begründet sich wahrscheinlich aus dem Mechanismus der Komplexbildung von McrBC.

Durch die Integration der in dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Resultate in den Kontext der bekannten Daten über McrBC, die vor allem in jüngerer Zeit veröffentlicht wurden, und durch Vergleiche des McrBC-Systems mit anderen Restriktionsendonukleasen und mit anderen mit DNA interagierenden Enzymsystemen konnte in dieser Arbeit eine neue Modellvorstellung der Funktionsweise des McrBC-Restriktionssystems entwickelt werden. Diese beschreibt die GTP-Hydrolyse durch McrB als notwendig für den Aufbau DNA-spaltaktiver McrBC-Komplexe. Die Untereinheit McrB bewirkt als NTP-aktiviertes Signalmolekül weiterhin über die Hydrolyse des Kofaktors eine DNA-Translokation durch den Komplex, die möglicherweise durch die Untereinheit McrC bewirkt wird. Analog zu den HsdR-Untereinheiten der Typ I Restriktionsenzyme verursachen die translozierenden Untereinheiten durch ein externes Signal, das aus einer mechanischen Behinderung der DNA-Translokation bei sich fortsetzender GTP-Hydrolyse besteht, eine DNA-Spaltreaktion, die analog zu den ebenfalls DNA-Translokation betreibenden Typ III Restriktionsenzymen in der Nähe der Erkennungssequenz erfolgt. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell zum Ablauf der DNA-Spaltung durch McrBC hat die Hydrolyse des Kofaktors durch McrB nicht die ausschließlich Funktion einer Energiequelle für den Antrieb einer DNA-Translokation, sondern moduliert die Aktivität der Untereinheit McrC. Damit unterscheidet sich dieses Modell von den bisher beschriebenen Vorstellungen, die die Funktion der GTP-Hydrolyse durch McrB nicht beschreiben oder von einer Rolle der GTP-Hydrolyse als direktem Antrieb der Translokation ausgehen, analog zu der ATP-Hydrolyse von Motorproteinen.

VI. QUELLEN- UND LITERATURVERZEICHNIS

Für sämtliche Angaben in dieser Arbeit, die nicht aus eigenen in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Erkenntnissen resultieren, ist die jeweils verwendete Quelle angegeben. Neben den in gedruckter Form publizierten Artikeln in Fachzeitschriften und Büchern, die untenstehend als Literaturzitate verzeichnet sind, beziehen sich die Quellenangaben teilweise auch auf elektronische Datenbanken, auf die *online* durch Nutzung des Computer-Internets zugegriffen werden kann. Die verwendeten Datenbanken sollen hier kurz beschrieben werden.

1. Verwendete Datenbanken

Einige in dieser Arbeit verwendete Informationsquellen sind elektronische Datenbanken, auf deren Inhalt mit Hilfe eines Computers durch Nutzung des Internets zugegriffen werden kann. Diese Datenbanken sind *online* jeweils über eine Adresse (URL, *Uniform Resource Locator*) in der *Sub-Level-Domain* WWW (*World Wide Web*) des Internets erreichbar.

1.1. NCBI, *GenBank*

NCBI ist die Abkürzung des *National Center for Biotechnology Information*, eines 1988 gegründeten molekularbiologischen Informationsdienstes der *National Library of Medicine* (NLM), einer Abteilung der *National Institutes of Health* (NIH), Bethesda, MD 20894, USA.

NCBI verwaltet mehrere Typen von öffentlich zugänglichen Datenbanken, z. B. die Gensequenz-Datenbank (*GenBank*) der NIH, einer Sammlung aller öffentlich verfügbaren DNA-Sequenzen (Benson *et al.*, 2000). *GenBank* ist Teil der *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, zu der auch DDBJ (*DNA DataBank of Japan*) und EMBL (*European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database*) gehören. Andere NCBI-Datenbanken sind Sammlungen von naturwissenschaftlichen Veröffentlichungen (Literatur-Datenbanken *PubMed* und *OMIM*) oder enthalten Informationen über Proteine, Strukturen, Taxonomie usw..

Alle in den Datenbanken registrierten Organismen, Gene, Proteine, Strukturen und Publikationen besitzen eine Registrierungsnummer (*identity number, ID*), z. B. Organismen

eine *Taxonomy ID*, Proteine eine *Protein ID* usw., anhand der sie eindeutig identifiziert werden können.

Der Zugriff auf die Datenbanken des NCBI durch Nutzung des *Internets* kann über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> erfolgen, dem URL der Übersicht der NCBI Internetseiten.

1.2. Swiss-Prot

Die öffentlich zugängliche Datenbank SWISS-PROT ist eine 1986 von der Universität Genf gegründete, detailliert kommentierte Sammlung von Informationen über Proteine (Bairoch & Apweiler, 2000) und wird vom SIB (*Schweizerisches Institut für Bioinformatik*, Genf, Schweiz) sowie seit 1987 vom EBI (*European Bioinformatics Institute*, Cambridge, UK) verwaltet. Der Zugriff auf die SWISS-PROT-Datenbank kann über den URL <http://www.expasy.ch/sprot> des ExPASy-Servers (*ExPASy für Expert Protein Analysis System*) des SIB erfolgen.

2. Literaturverzeichnis

Die Namen von regelmäßig erscheinenden Zeitschriften, in denen Artikel, die in dieser Arbeit als Quellenangabe für Sachverhalte und Zitate angegeben werden, veröffentlicht wurden, sind in folgender Literaturliste in gängiger Weise abgekürzt worden.

Allen, D. J.; Makhov, A.; Grilley, M.; Taylor, J.; Thresher, R.; Modrich, P. & Griffith, J. D.
MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism.
EMBO J. 16 (1997), S. 4467 - 4476

Amouyal, M.; Mortensen, L.; Buc, H. & Hammer, K.
Single and double loop formation when deoR repressor binds to its natural operator sites.
Cell 58 (1989), S. 545 - 551

Aggarwal, A. K.
Structure and function of restriction endonucleases.
Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995), S. 11 - 19

Ahmad, I.; Krishnamurthy, V. & Rao, D. N.
DNA recognition by the *EcoP15I* and *EcoP1* modification methyltransferases.
Gene 157 (1995), S. 143 - 147

- Allen, D. J.; Makhov, A.; Grilley, M.; Taylor, J.; Thresher, R.; Modrich, P. & Griffith, J. D.**
MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism.
EMBO J. 16 (1997), S. 4467 - 4476
- Anderson, J. E.**
Restriction endonucleases and modification methylases.
Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), S. 24 - 30
- Aravind, L.; Walker, D. R. & Koonin, E. V.**
Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems.
Nucleic Acids Res. 27 (1999), S. 1223 - 1242
- Arber, W. & Dussoix, D.**
Host Specificity of DNA. Produced by *Escherichia coli*. I. Host Controlled Modification of Bacteriophage λ .
J. Mol. Biol. 5 (1962), S. 18 - 36 und S. 37 - 49
- Arber, W. & Linn, S.**
DNA modification and restriction.
Annu. Rev. Biochem. 38 (1969), S. 467 - 500
- Athanasiadis, A.; Vlassi, M.; Kotsifaki, D.; Tucker, P. A.; Wilson, K. S. & Kokkinidis, M.**
Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*.
Nat. Struct. Biol. 1 (1994), S. 469 - 475
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. & Struhl, K.**
Current Protocols in Molecular Biology.
Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1989)
- Avery, O. T.; Macleod, C. M. & McCarty, M.**
Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. I. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type III.
J. Exp. Med. 79 (1944), S. 137 - 158
- Backer, O. & Colson, C.**
Two-step cloning and expression in *Escherichia coli* of the DNA restriction-modification system *StyLTI* from *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. 173 (1991), S. 1321 - 1327
- Bairoch, A. & Apweiler, R.**
The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000.
Nucleic Acids Res. 28 (2000), S. 45 - 48
- Ban, C. & Yang, W.**
Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis.
Cell 95 (1998a), S. 541 - 552

Ban, C. & Yang, W.

Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases.

EMBO J. 17 (1998b), S. 1526 - 1534

Beary, T. P.; Braymer, H. D. & Achberger, E. C.

Evidence of participation of McrB_s in McrBC restriction in *Escherichia coli* K-12.

J. Bacteriol. 179 (1997), S. 7768 - 7775

Benjamin, H. W. & Cozzarelli, N. R.

Geometric arrangements of Tn3 resolvase sites.

J. Biol. Chem. 265 (1990), S. 6441 - 6447

Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Rapp, B. A. & Wheeler, D. L.
GenBank.

Nucleic Acids Res. 28 (2000), S. 15 - 18

Bertani, G. & Weigle, J. J.

Host controlled variation in bacterial viruses.

J. Bacteriol. 65 (1953), S. 113 - 121

Bickle, T. A.

The ATP-dependent restriction enzymes

in: S. M. Linn & R. J. Roberts (Herausgeber), *Nucleases*, 1. Aufl. (1982), S. 85 - 108

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Bickle, T. A.

The ATP-dependent restriction enzymes

in: S. M. Linn, R. S. Lloyd & R. J. Roberts (Herausgeber), *Nucleases*, 2. Aufl. (1993), S. 89 - 109

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Bickle, T. A.; Brack, C. & Yuan, R.

ATP-induced conformational changes in the restriction endonuclease from *Escherichia coli* K-12.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75 (1978), S. 3099 - 3103

Bickle, T. A. & Krüger, D. H.

Biology of DNA Restriction

Microbiol. Rev. 57 (1993), S. 434-450

Bird, L. E.; Subramanya, H. S. & Wigley, D. B.

Helicases: a unifying structural theme?

Curr. Opin. Struct. Biol. 8 (1998), S. 14 - 18

Birnboim, H. & Doly, J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. 7 (1979), S. 1513 - 1523

- Bitinaite, J.;** Grigaite, R.; Maneliene, Z; Butkus, V. & Janulaitis, A.
Esp3I - a novel type II restriction endonuclease from *Hafnia alvei* that recognizes the sequence 5'-CGTCTC(N)_{1/5}-3'.
Nucleic Acids Res. 19 (1991), S. 5076
- Bitinaite, J.;** Wah, D. A.; Aggarwal, A. K. & Schildkraut, I.
FokI dimerization is required for DNA cleavage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), S. 10570 - 10575
- Blattner, F. R.;** Ill, G. P.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B. & Shao, Y.
The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12.
Science 277 (1997), S. 1453 - 1462
- Boocock, M. R.;** Brown, J. L. & Sherratt, D. J.
Structural and catalytic properties of specific complexes between Tn3 resolvase and the recombination site res.
Biochem. Soc. Trans. 14 (1986), S. 214 - 216
- Borck, K.;** Beggs, J. D.; Brammar, W. J.; Hopkins, A. S. & Murray, N. E.
The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda.
Mol. Gen. Genet. 146 (1976), S. 199 - 207
- Bourne, H. R.;** Sanders, D. A. & McCormick, F.
The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.
Nature 348 (1990), S. 125 - 132
- Bourne, H. R.;** Sanders, D. A. & McCormick, F.
The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.
Nature 349 (1991), S. 117 - 127
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D.**
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. 41 (1969), S. 459 - 472
- Bradford, M. H.**
A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 205 (1976), S. 22 - 26
- Brunger, A. T.;** Milburn, M. V.; Tong, L.; deVos, A. M.; Jancarik, J.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Ohtsuka, E. & Kim, S. H.
Crystal structure of an active form of RAS protein, a complex of a GTP analog and the HRAS p21 catalytic domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), S. 4849 - 4853

- Burland, V.;** Plunkett III., G.; Sofia, H. J.; Daniels, D. L. & Blattner, F. R.
Analysis of the *Escherichia coli* genome VI: DNA sequence of the region from 92.8 through 100 minutes.
Nucleic Acids Res. 23 (1995), S. 2105 - 2119
- Bustamante, C. & Rivetti, C.**
Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope.
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25 (1996), S. 395 - 429
- Bustamante, C.;** Keller, D. & Yang, G.
Scanning force microscopy of nucleic acids and nucleoprotein assemblies.
Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), S. 363 - 372
- Bustamante, C.;** Erie, D. A. & Keller, D.
Biochemical and structural applications of scanning force microscopy.
Curr. Opin. Struct. Biol. 4 (1994), S. 750 - 760
- Burckhardt, J.;** Weisemann, J. & Yuan, R.
Charakterization of the DNA methylase activity of the restriction enzyme from *Escherichia coli* K.
J. Biol. Chem. 256 (1981), S. 4024 - 4032
- Buryanov, Y. I.;** Bogdarina, I. G. & Bayev, A. A.
Site specificity and chromatographic properties of *E. coli* K12 and *EcoRII* DNA-cytosine methylases.
FEBS Letters 88 (1978), S. 251 - 254
- Carlier, M. F. & Pantaloni, D.**
Tubulin as a G-Protein: Regulation of tubulin-tubulin interactions by GTP-hydrolysis.
in: L. Bosch, B. Kraal & A. Parmeggiani (Herausgeber), *The Guanine-Nucleotide Binding Proteins.* (1989), S. 379 - 384
Plenum Press, New York & London
- Cassel, D. & Selinger, Z.**
Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), S. 4155 - 4159
- Chang, A. C. Y. & Cohen S. N.**
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.
J. Bacteriol. 134 (1978), S. 1141 - 1156
- Cheng, X.;** Balendiran, K.; Schildkraut, I. & Anderson, J. E.
Structure of *PvuII* endonuclease with cognate DNA.
EMBO J. 13 (1994), S. 3927 - 3935

- Christ, F.; Schoettler, S.; Wende, W.; Steuer, S.; Pingoud, A. & Pingoud, V.**
The monomeric homing endonuclease PI-*SceI* has two catalytic centres for cleavage of the two strands of its DNA substrate.
EMBO J. 18 (1999), S. 6908 - 6916
- Conrad, M. & Topal, M. D.**
Modified DNA fragments activate *NaeI* cleavage of refractory DNA sites.
Nucleic Acids Res. 20 (1992), S. 5127 - 5130
- Covarrubias, L.; Cervantes, L.; Covarrubias, A.; Soberon, X.; Vichido, I.; Blanco, A.; Kupersztoch-Portnoy, Y. M. & Bolivar, F.**
Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328.
Gene 13 (1981), S. 25 - 35
- Craigie, R. & Mizuuchi, K.**
Role of DNA topology in Mu transposition: mechanism of sensing the relative orientation of two DNA segments.
Cell 45 (1986), S. 793 - 800
- de la Cruz, N. B.; Weinreich, M. D.; Wiegand, T. W.; Krebs, M. P. & Reznikoff, W. S.**
Characterization of the Tn5 transposase and inhibitor proteins: a model for the inhibition of transposition.
J. Bacteriol. 175 (1993), S. 6932 - 6938
- Davies, G. P.; Powell, L. M.; Webb, J. L.; Cooper, L. P. & Murray, N. E.**
EcoKI with an amino acid substitution in any one of seven DEAD-box motifs has impaired ATPase and endonuclease activities.
Nucleic Acids Res. 26 (1998), S. 4828 - 4836
- Davies, G. P.; Martin, I.; Sturrock, S. S.; Cronshaw, A.; Murray, N. E. & Dryden, D. T.**
On the structure and operation of type I DNA restriction enzymes.
J. Mol. Biol. 290 (1999), S. 565 - 579
- Dever, T. E.; Glynias, M. J. & Merrick, W. C.**
GTP-binding domain: Three consensus sequence elements with distinct spacing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), S. 1814 - 1818
- Dickerson, R & Geis, I.**
The Structure and Action of Proteins.
Harper & Row, New York (1969), S. 59 - 66
- Dila, D.; Sutherland, E.; Moran, L.; Slatko, B. & Raleigh, E. A.**
Genetic and sequence organization of the *mcrBC* locus of *Escherichia coli* K-12.
J. Bacteriol. 9 (1990), S. 4888 - 4900
- Dougan, G. & Sherratt, D.**
The transposon Tn1 as a probe for studying ColE1 structure and function.
Mol. Gen. Genet. 151 (1977), S. 151 - 160

- Dreier, J.;** MacWilliams, M. P. & Bickle, T. A.
DNA cleavage by the type IC restriction-modification enzyme *EcoR124II*.
J. Mol. Biol. 264 (1996), S. 722 - 733
- Dröge, P.**
Protein tracking-induced supercoiling of DNA: a tool to regulate DNA transactions *in vivo*?
BioEssays 16 (1994), S. 91 - 99
- Dryden, D. T.;** Cooper, L. P. & Murray N. E.
Purification and characterization of the methyltransferase from the type I restriction and modification system of *Escherichia coli* K12.
J. Biol. Chem. 268 (1993), S. 13228 - 13236
- Dryden, D. T.;** Cooper, L. P.; Thorpe, P. H. & Byron, O.
The *in vitro* assembly of the *EcoKI* type I DNA restriction/modification enzyme and its *in vivo* implications.
Biochemistry 36 (1997), S. 1065 - 1076
- Dunn, T. M.;** Hahn, S.; Ogden, S. & Schleif, R. F.
An operator at -280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), S. 5017 - 5020
- Eaton, D.;** Rodriguez, H. & Vehar, G. A.
Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity.
Biochemistry 25 (1986), S. 505 - 512
- Ellis, D. J.;** Dryden, D. T.; Berge, T.; Edwardson, J. M. & Henderson, R. M.
Direct observation of DNA translocation and cleavage by the *EcoKI* endonuclease using atomic force microscopy.
Nat. Struct. Biol. 6 (1999), S. 15 - 17
- Endlich, B. & Linn, S.**
The DNA restriction endonuclease of *Escherichia coli* B. I. Studies of the DNA translocation and the ATPase activities.
J. Biol. Chem. 260 (1985), S. 5720 - 5728
- Eskin, B. & Linn, S.**
The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. II. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the restriction endonuclease.
J. Biol. Chem 247 (1972a), S. 6183 - 6191
- Eskin, B. & Linn, S.**
The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. III. Studies of the restriction adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem 247 (1972b), S. 6192 - 6196

- Feuerstein, J.;** Goody, R. S. & Wittinghofer, A.
Preparation and characterization of nucleotide-free and metal ion-free p21 "apoprotein".
J. Biol. Chem. 262 (1987); S. 8455 - 8458
- Fickert, R. & Müller-Hill, B.**
How Lac repressor finds lac operator in vitro.
J. Mol. Biol. 226 (1992), S. 59 - 68
- Fleischman, R. A.;** Campbell, J. L. & Richardson, C. C.
Modification and restriction of T-even bacteriophages.
J. Biol. Chem. 251 (1976), S. 1561 - 1570
- Fried, M. & Crothers, D. M.**
Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.
Nucleic Acids Res. 9 (1981), S. 6505 - 6525
- Friedberg, E. C.;** Walker, G. C. & Siede, W.
DNA Repair and Mutagenesis.
ASM Press, Washington, D. C. (1995)
- Fujikawa, K.;** Legaz, M. E. & Davie, E. W.
Bovine factor X 1 (Stuart factor). Mechanism of activation by protein from Russell's viper venom.
Biochemistry 11 (1972), S. 4892 - 4899
- Fuller-Pace, F. V.;** Bullas, L. R.; Delius, H. & Murray, N. E.
Genetic recombination can generate altered restriction specificity.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81 (1984), S. 6095 - 6099
- Gabbara, S. & Bhagwat, A. S.**
Interaction of *EcoRII* endonuclease with DNA substrates containing single recognition sites.
J. Biol. Chem. 267 (1992), S. 18623 - 18630
- Garner, M. M. & Revzin, A.**
A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system.
Nucleic Acids Res. 9 (1981), S. 3047 - 3060
- Gast, F. U.;** Brinkmann, T.; Pieper, U.; Krüger, T.; Noyer-Weidner, M. & Pingoud, A.
The recognition of methylated DNA by the GTP-dependent restriction endonuclease McrBC resides in the N-terminal domain of McrB.
Biol. Chem. 378 (1997), S. 975- 982
- Geier, G. E. & Modrich, P.**
Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of *DpnI* endonuclease.
J. Biol. Chem. 254 (1979), S. 1408 - 1413

Gellert, M. & Nash, H.

Communication between segments of DNA during site-specific recombination.
Nature 325 (1987), S. 401 - 404

Gideon, P.; John, J.; Frech, M.; Lautwein, A.; Clark, R.; Scheffler, J. E. & Wittinghofer, A.
Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity.
Mol. Cell. Biol. 12 (1992), S. 2050 - 2056

Gorbalenya, A. E.; Koonin, E. V.; Donchenko, A. P. & Blinov, V. M.

Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes.
Nucleic Acids Res. 17 (1989), S. 4713 - 4730

Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V.

Endonuclease (R) subunits of type-I and type-III restriction-modification enzymes contain a helicase-like domain.
FEBS letters 291 (1991), S. 277 - 281

Gubler, M.; Braguglia, D.; Meyer, J.; Piekarowicz, A. & Bickle, T. A.

Recombination of constant and variable modules alters DNA sequence recognition by type IC restriction-modification enzymes.
EMBO J. 11 (1992), S. 233 - 240

Haberman, A.

The bacteriophage P1 restriction endonuclease.
J. Mol. Biol. 89 (1974), S. 545 - 563

Hadi, S. M.; Bachi, B.; Iida, S. & Bickle, T. A.

DNA restriction-modification enzymes of phage P1 and plasmid p15B. Subunit functions and structural homologies.
J. Mol. Biol. 165 (1983), S. 19 - 34

Hahn, M.

Untersuchung zur Überexpression, Isolierung und Charakterisierung des McrB-Proteins aus *Escherichia coli* K-12.
Diplomarbeit (1991), Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule, Hannover

Hall, M. C. & Matson, S. W.

The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity.
J. Biol. Chem. 274 (1999), S. 1306 - 1512

Hanahan, D.

Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids.
J. Mol. Biol. 166 (1983); S. 557 - 580

Hanahan, D.

Techniques for transformation of *E. coli*.

in: D. M. Glover (Herausgeber), *DNA-Cloning, Vol 1: A Practical Approach*. (1985), S. 109 - 135

IRL Press, Oxford, U. K.

Hansma, H. G. & Hoh, J. H.

Biomolecular imaging with the atomic force microscope.

Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23 (1994), S. 115 - 139

Hattman, S.; Brooks, J. E. & Masurekar, M.

Sequence specificity of the P1 modification methylase (*M.Eco* P1) and the DNA methylase (*M.Eco* dam) controlled by the *Escherichia coli* dam gene.

J. Mol. Biol. 126 (1978), S. 367 - 380

Heitman, J. & Model, P.

Site-specific methylases induce the SOS DNA repair response in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 169 (1987), S. 3243 - 3250

Herendeen, D.R.; Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P.

A transcriptional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA.

Science 256 (1992), S. 1298 - 12303

Hershey, A. D. & Chase, M.

Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage.

J. Gen. Physiol. 36 (1952), S. 39 - 56

Hill, C.; Miller, L. A. & Klaenhammer, T. R.

In vivo genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage.

J. Bacteriol. 173 (1991), S. 4363 - 4370

Hochschild, A. & Ptashne, M.

Cooperative binding of lambda repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix.

Cell 44 (1986), S. 681 - 687

Hochschild, A.; Irwin, N. & Ptashne, M.

Repressor structure and the mechanism of positive control.

Cell 32 (1983), S. 319 - 325

Hochuli, E.; Dobeli, H. & Schacher, A.

New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.

J. Chromatogr. 411 (1987), S. 177 - 184

- Hoffenberg, S.;** Nikolova, L.; Pan, J. Y.; Daniel, D. S.; Wessling-Resnick, M.; Knoll, B. J. & Dickey, B. F.
Functional and structural interactions of the Rab5 D136N mutant with xanthine nucleotides.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 215 (1995), S. 241 - 249
- Hwang, Y. W. & Miller, D. L.**
A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein.
J. Biol. Chem. 262 (1987), S. 13081 - 13085
- Iida, S.;** Meyer, J.; Bachi, B.; Carlemalm, M. S.; Schrickel, S.; Bickle, T. A. & Arber, W.
DNA restriction-modification gene of phage P1 and plasmid p15B.
J. Mol. Biol. 165 (1983), S. 1 - 18
- Janscak, P. & Bickle, T. A.**
The DNA recognition subunit of the type IB restriction-modification enzyme *EcoAI* tolerates circular permutations of its polypeptide chain.
J. Mol. Biol. 284 (1998), S. 937 - 948
- Janscak, P.;** Abadjieva, A. & Firman, K.
The type I restriction endonuclease *R.EcoR124I*: over-production and biochemical properties.
J. Mol. Biol. 257 (1996), S. 977 - 991
- Janscak, P.;** Dryden, D. T. & Firman, K.
Analysis of the subunit assembly of the typeIC restriction-modification enzyme *EcoR124I*.
Nucleic Acids Res. 26 (1998), S. 4439 - 4445
- Janscak, P.;** MacWilliams, M. P.; Sandmeier, U.; Nagaraja, V. & Bickle, T. A.
DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes.
EMBO J. 18 (1999), S. 2638 - 2647
- Janulaitis, A.;** Petrusyte, M.; Maneliene, Z.; Klimasauskas, S. & Butkus, V.
Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase - prototypes of a new class (type IV)
Nucleic Acids Res. 20 (1992a), S. 6043 - 6049
- Janulaitis, A.;** Vaisvila, R.; Timinskas, A.; Klimasauskas, S. & Butkus, V.
Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzymes.
Nucleic Acids Res. 20 (1992b), S. 6051 - 6056
- Jentsch, S.;** Gunthert, U. & Trautner, T. A.
DNA methyltransferases affecting the sequence 5'CCGG.
Nucleic Acids Res. 9 (1981), S. 2753 - 2759
- Jiricny, J.**
Replication errors: cha(lle)nging the genome.
EMBO J. 17 (1998), S. 6427 - 6436

Jo, K. & Topal, M. D.

DNA topoisomerase and recombinase activities in *NaeI* restriction endonuclease.
Science 267 (1995), S. 1817 - 1820

Kan, N. C.; Lautenberger, J. A.; Edgell, M. H. & Hutchinson, C. A.

The nucleotide sequence recognized by the *Escherichia coli* K12 restriction and modification enzymes.

J. Mol. Biol. 130 (1979), S. 191 - 209

Kapfer, W.

Klonierung des R.BsuFI Restriktionsendonuklease-Gens von B. subtilis und Charakterisierung des Enzyms.

Dissertation (1991), MPI für Molekulare Genetik, Berlin

Kapfer, W.; Walter, J. & Trautner, T. A.

Cloning, characterization and evolution of the *BsuFI* restriction endonuclease gene of *Bacillus subtilis* and purification of the enzyme.

Nucleic Acids Res. 19 (1991), S. 6457- 6463

Kauc, L. & Piekarowicz, A.

Purification and properties of a new restriction endonuclease from *Haemophilus influenzae* Rf.

Eur. J. Biochem. 92 (1978), S. 417 - 426

Kelleher, J. E. & Raleigh, E. A.

A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides.

J. Bacteriol. 16 (1991), S. 5220 - 5223

Kim, B. C.; Kim, K.; Park, E. H. & Lim, C. J.

Nucleotide Sequence and revised map location of the *arn* gene from bacteriophage T4.

Mol. Cells 7 (1997), S. 694 - 696

Kita, K.; Kotani, H.; Ohta, H.; Yanase, H. & Kato, N.

StsI, a new *FokI* isoschizomer from *Streptococcus sanguis* 54, cleaves 5' GGATG(N)_{10/14} 3'.

Nucleic Acids Res. 20 (1992a), S. 618

Kita, K.; Suisha, M.; Kotani, H. & Yanase, H.

Cloning and sequence analysis of the *StsI* restriction-modification gene: presence of homology to *FokI* restriction-modification enzymes.

Nucleic Acids Res. 20 (1992b), S. 4167 - 4172

Kjeldgaard, M.; Nyborg, J. & Clark, B. F. C.

The GTP binding motif: variations on a theme.

FASEB J. 10 (1996), S. 1347 - 1368

- Kleuss, C.;** Raw, A. S.; Lee, E.; Sprang, S. R. & Gilman, A. G.
Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), S. 9828 - 9831
- Kong, H.**
Analyzing the functional organization of a novel restriction modification system, the *BcgI* system.
J. Mol. Biol. 279 (1998), S. 823 - 832
- Kong, H.;** Morgan, R. D.; Maunus, R. E. & Schildkraut, I.
A unique restriction endonuclease, *BcgI*, from *Bacillus coagulans*.
Nucleic Acids Res. 21 (1993), S. 987 - 991
- Krab, I. M. & Parmeggiani, A.**
EF-Tu, a GTPase odyssey.
Biochim. Biophys. Acta 1443 (1998), S. 1 - 22
- Krämer, H.;** Niemoller, M.; Amouyal, M.; Revet, B.; von Wilcken-Bergmann, B. & Müller-Hill, B.
lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced lac operators.
EMBO J. 6 (1997), S. 1481 - 1491
- Krüger, T.**
Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung der Untereinheiten des McrBC-Restriktionssystems von Escherichia coli K-12.
Dissertation (1992), Freie Universität Berlin
- Krüger, D.H.;** Barcak, G. J.; Reuter, M. & Smith, H. O.
EcoRII can be activated to cleave refractory DNA recognition sites.
Nucleic Acids Res. 16 (1988), S. 3997 - 4008
- Krüger, T.;** Grund, C; Wild, C. & Noyer-Weidner, M.
Characterization of the *mcrBC* region of *Escherichia coli* K-12 wild-type and mutant strains.
Gene 114 (1992), S. 1 - 12
- Krüger, D. H.;** Kupper, D.; Meisel, A.; Reuter, M. & Schroeder, C.
The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral DNA genomes.
FEMS Microbiol Rev. 17 (1995a), S. 177 - 184
- Krüger, T.;** Wild, C. & Noyer-Weidner, M.
McrB: a prokaryotic protein specifically recognizing DNA containing modified cytosine residues.
EMBO J. 14 (1995b), S. 2661 - 2669
- Kunz, A.;** Mackeldanz, P.; Mucke, M.; Meisel, A.; Reuter, M.; Schroeder, C. & Krüger, D. H.
Mutual activation of two restriction endonucleases: interaction of *EcoP1* and *EcoP15*.
Biol. Chem. 379 (1998), S. 617 - 620

Laemmli, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227 (1970), S. 680 - 685

Lahue, R. S.; Au, K. G. & Modrich, P.

DNA mismatch correction in a defined system.
Science 245 (1989), S. 160 - 164

Landschulz, W. H.; Johnson, P. F. & McKnight, S. L.

The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.
Science 240 (1988), S. 1759 - 1764

Loenen, W. A.; Daniel, A. S.; Braymer, H. D. & Murray, N. E.

Organization and sequence of the *hsd* genes of *Escherichia coli* K-12.
J. Mol. Biol. 198 (1987), S. 159 - 170

Lohman, T. M. & Bjornson, K. P.

Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding.
Annu. Rev. Biochem. 65 (1996), S. 169 - 214

Lucas-Lenard, J. & Lipmann, F.

Separation of three microbial amino acid polymerization factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55 (1966), S. 1562 - 1566

Lui, A. C. P.; McBride, B. C.; Vovis, G. F. & Smith, M.

Site specific endonuclease from *Fusobacterium nucleatum*.
Nucleic Acids Res. 6 (1979), S. 1 - 15

Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J.

Predicting coiled coils from protein sequences.
Science 252 (1991), S. 1162 - 1164

Luria, S. E. & Human, M. L.

A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses.
J. Bacteriol. 64 (1952), S. 557 - 559

Malone, J. A.

pGEX-2T: A cloning vector for the inducible expression of genes as glutathione S-transferase fusion proteins containing a thrombin cleavage site.
(unpublished), Pharmacia Biotech Inc., Milwaukee, USA (1994)

Mandel, M. & Higa, A.

Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection.
J Mol. Biol. 53 (1970), S. 159 - 162

Mann, M. B. & Smith, H. O.

Specificity of *HpaII* and *HaeIII* DNA methylases.
Nucleic Acids Res. 4 (1977), S. 4211 - 4221

May, M. S. & Hattman, S.

Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes.

J. Bacteriol. 123 (1975), S. 768 - 770

Meisel, A.

Wirkungsweise von Typ-III-Modifikations-/Restriktions-Systemen.

Dissertation (1993), Humboldt Universität, Berlin.

Meisel, A.; Bickle, T. A.; Kruger, D. H. & Schroeder, C.

Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage.

Nature 355 (1992), S. 467 - 469

Meisel, A.; Mackeldanz, P.; Bickle, T. A.; Krüger, D. H. & Schroeder, C.

Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis.

EMBO J. 14 (1995), S. 2958 - 2966

Meiss, G.; Franke, I.; Gimadutdinow, O.; Urbanke, C. & Pingoud, A.

Biochemical characterization of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 non-specific nuclease NucA and its inhibitor NuiA.

Eur. J. Biochem. 251 (1998), S. 924 - 934

Meselson, M. & Yuan, R.

DNA restriction enzyme from *E.coli*.

Nature 217 (1968), S. 1110 - 1114

Mi, S. & Roberts, R. J.

How *M.MspI* and *M.HpaII* decide which base to methylate.

Nucleic Acids Res. 20 (1992), S. 4811 - 4816

Miller, D. L. & Weissbach, H.

Elongation factor Tu and the aminoacyl-tRNA · EFTu · GTP complex.

Methods Enzymol. 30 (1974), S. 219 - 232

Mitchell, A. H. & West, S. C.

Hexameric rings of *Escherichia coli* RuvB protein. Cooperative assembly, processivity and ATPase activity.

J. Mol. Biol. 243 (1994), S. 208 - 215

Modrich, P.

DNA Mismatch Correction.

Annu. Rev. Biochem. 56 (1987), S. 435 - 466

Modrich, P.

Mechanismus and biological Effects of Mismatch Repair.

Annu. Rev. Genet. 25 (1991), S. 229 - 253

- Mücke, M.;** Lurz, R.; Mackeldanz, P.; Behlke, J.; Krüger, D. H & Reuter, M.
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. 275 (2000), S. 30631 - 30637
- Müller-Hill, B.**
The function of auxiliary operators.
Mol. Microbiol. 29 (1998), S. 13 - 18
- Mullis, K. B.**
The unusual origin of the polymerase chain reaction.
Scientific American (1990), S. 36 - 43
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.**
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 155 (1987), S. 335 - 350
- Mullis, K. B.;** Ferré, F. & Gibbs, R. A.
The Polymerase Chain Reaction.
Birkhäuser, Boston (1994)
- Murray, N. E.;** Batten, P. L. & Murray, K.
Restriction of bacteriophage lambda by *Escherichia coli* K.
J. Mol. Biol. 81 (1973), S. 395 - 407
- Murray, N.E.;** Gough, J. A.; Suri, B. & Bickle, T. A.
Structural homologies among type I restriction-modification systems.
EMBO J. 1 (1982), S. 535 - 539
- Murray, N. E.;** Daniel, A. S.; Cowan, G. M. & Sharp, P. M.
Conservation of motifs within the unusually variable polypeptide sequences of type I restriction and modification enzymes.
Mol. Microbiol. 9 (1993), S. 133 - 143
- Mutschler, E.**
Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
Wissensch. Verlagsgesellschaft Stuttgart, 5. Aufl. (1986), S. 595 - 601
- Nagai K. & Thogersen, H. C.**
Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*.
Nature 309 (1984), S. 810 - 812
- Newman, P. C.;** Williams, D. M.; Cosstick, R.; Seela, F. & Connolly, B. A.
Interaction of the *EcoRV* restriction endonuclease with the deoxyadenosine and thymidine bases in its recognition hexamer d(GATATC).
Biochemistry 29 (1990), S. 9902 - 9910

- Newman, M.;** Strzelecka, T.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. & Aggarwal, A. K.
Structure of restriction endonuclease *Bam*HI and its relationship to *Eco*RI.
Nature 368 (1994), S. 660 - 664
- Newman, M.;** Strzelecka, T.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. & Aggarwal, A. K.
Structure of *Bam*HI endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding.
Science 269 (1995), S. 656 - 663
- Norrande, J.;** Kempe, T. & Messing, J.
Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis.
Gene 26 (1983), S. 101 - 106
- Noyer-Weidner, M.;** Diaz, R. & Reiners, L.
Cytosine-specific DNA modification interferes with plasmid establishment in *Escherichia coli* K-12: Involvement of *rglB*.
Mol. Gen. Genet. 205 (1986), S. 469 - 475
- Noyer-Weidner, M. & Trautner, T. A.**
Methylation of DNA in Prokaryotes.
in: J. P. Jost & H. D. Saluz (Herausgeber), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance* (1993)
Birkhäuser Verlag, Basel
- O'Sullivan, D. J.;** Zagula, K. & Klaenhammer, T. R.
In vivo restriction by *Lla*I is encoded by three genes, arranged in an operon with *llaIM*, on the conjugative *Lactococcus* plasmid pTR2030.
J. Bacteriol. 177 (1995), S. 134 - 143
- Oller, A. R.;** Vanden Broek, W.; Conrad, M. & Topal, M. D.
Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species.
Biochemistry 30 (1991), S. 2543 - 2549
- Oosawa, F.**
The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells.
Genes Cells. 5 (2000), S. 9 - 16
- Ostrander, E. A.;** Benedetti, P. & Wang, J. C.
Template supercoiling by a chimera of yeast GAL4 protein and phage T7 RNA polymerase.
Science, 249 (1990), S. 1261 - 1265
- Panne D.;** Raleigh, E.A. & Bickle, T.A.
McrB_s, a modulator peptide for McrBC activity.
EMBO J. 18 (1998), S. 5477 - 5483
- Panne, D.;** Raleigh, E.A. & Bickle, T. A.
The McrBC endonuclease translocates DNA in a reaction dependent on GTP hydrolysis.
J. Mol. Biol. 290 (1999), S. 49 - 60

Peden, K. W.

Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322.

Gene 22 (1983), S. 277 - 280

Petrusyte, M.; Bitinaite, J.; Menkevicius, S.; Klimasauskas, S.; Butkus, V. & Janulaitis, A.

Restriction endonucleases of a new type.

Gene 74 (1988), S. 89 - 91

Pieper, U.; Brinkmann, T.; Krüger, T.; Noyer-Weidner, M. & Pingoud, A.

Characterization of the interaction between the restriction endonuclease McrBC from *E. coli* and its cofactor GTP.

J. Mol. Biol. 272 (1997), S. 190 - 199

Pieper, U.; Schweitzer, T.; Groll, D. H.; Gast, F. U. & Pingoud, A.

The GTP-binding Domain of McrB: More Than Just a Variation on a Common Theme?

J. Mol. Biol. 292 (1999a), S. 547 - 556

Pieper, U.; Schweitzer, T.; Groll, D. H. & Pingoud, A.

Defining the Location and Function of Domains of McrB by Deletion Mutagenesis.

Biol. Chem. 380 (1999b), S. 1225 - 1230

Pingoud, A. & Jeltsch, A.

Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases.

Eur. J. Biochem. 246 (1997), S. 1 - 22

Pingoud, A.; Urbanke, C.; Krauss, G.; Peters, F. & Maass, G.

Ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP and aminoacyl-tRNA: an equilibrium study.

Eur. J. Biochem. 78 (1977), S. 403 - 409

Pingoud, A.; Alves, J. & Geiger, R.

Restriction enzymes.

in: M. M. Burrell (Herausgeber), *Methods in Molecular Biology, Vol. 16: Enzymes of Molecular Biology* (1993), S. 107 - 200

Humana Press Inc., Totowa, New Jersey

Platt, T.

Transcription termination and the regulation of gene expression.

Annu. Rev. Biochem. 55 (1986), S. 339 - 372

Powell, L. M.; Dryden, D. T. & Murray, N. E.

Sequence-specific DNA binding by *EcoKI*, a type IA DNA restriction enzyme.

J. Mol. Biol. 283 (1998), S. 963 - 976

Price, C.; Pripfl, T. & Bickle, T. A.

EcoR124 and *EcoR124/3*: the first members of a new family of type I restriction and modification systems.

Eur. J. Biochem. 167 (1987), S. 111 - 115

Radman, M. & Wagner, R.

Die DNA-Verdoppelung - ein Präzisionsprozess.
Spektrum der Wissenschaft 10 (1988), S. 48 - 55

Raleigh, E. A.

Organization and function of the *mcrBC* genes of *Escherichia coli* K-12.
Mol. Microbiol. 6 (1992), S. 1079 - 1086

Raleigh, E. & Wilson, G.

Escherichia coli K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), S. 9070 - 9074

Raleigh, E. A.; Murray, N. E.; Revel, H.; Blumenthal, R. M.; Westaway, D.; Reith, A. D.; Rigby, P. W.; Elhai, J. & Hanahan, D.

McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning.
Nucleic Acids Res. 4 (1988), S. 1563 - 1575

Raleigh, E. A.; Trimarchi, R. & Revel, H.

Genetic and Physical Mapping of the *mcrA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) Loci in *Escherichia coli* K12.
Genetics 122 (1989), S. 279 - 296

Reiser, J. & Yuan, R.

Purification and properties of the P15 specific restriction endonuclease from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 252 (1977), S. 451 - 456

Reitzer, L. J. & Magasanik, B.

Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter.
Cell 45 (1986), S. 785 - 792

Rens-Domiano, S. & Hamm, H. E.

Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins.
FASEB J. 9 (1995), S. 1059 - 1066

Reuter, M.; Kupper, D.; Meisel, A.; Schroeder, C. & Krüger, D. H.

Cooperative binding properties of restriction endonuclease *EcoRII* with DNA recognition sites.
J. Biol. Chem. 273 (1998), S. 8294 - 8300

Revel, H. R.

Restriction of non-glucosylated T-even bacteriophage: properties of permissive mutants of *Escherichia coli* B and K12.
Virology 31 (1967), S. 688 - 701

Revel, H. R.

DNA modification: Glucosylation.

in: C. K. Mathews, E. M. Kutter, G. Mosig & P. Berget (Herausgeber), *Bacteriophage T4*. (1983)

American Society for Microbiology, Washington D. C.

Roberts, R. J. & Halford, S. E.

Type II Restriction Endonucleases.

in: S. M. Linn, R. S. Lloyd & R. J. Roberts (Herausgeber), *Nucleases*, 2. Aufl. (1993), S. 35 - 88

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Roberts, R. J. & Macelis, D.

REBASE - restriction enzymes and methylases.

Nucleic Acids Res. 27 (1999), S. 312 - 313

Roberts, R. J. & Macelis, D.

REBASE - restriction enzymes and methylases.

Nucleic Acids Res. 28 (2000), S. 306 - 307

Roberts, R. J. & Macelis, D.

REBASE-restriction enzymes and methylases.

Nucleic Acids Res. 29 (2001), S. 268 - 269

Rosamond, J.; Endlich, B. & Linn, S.

Electron microscopic studies of the mechanism of action of the restriction enzyme of *Escherichia coli* B.

J. Mol. Biol. 129 (1979), S. 619 - 635

Ross T. K. & Braymer, H. D.

Localization of a genetic region involved in McrB restriction by *Escherichia coli* K-12.

J. Bacteriol. 4 (1987), S. 1757 - 1759

Ross, T. K.; Achberger, E. C. & Braymer, H. D.

Characterization of the *Escherichia coli* modified cytosine restriction (*mcrB*) gene.

Gene 61 (1987), S. 277 - 289

Ross, T. K.; Achberger, E. C. & Braymer, H. D.

Nucleotide sequence of the McrB region of *Escherichia coli* K-12 and evidence for two independent translational initiation sites at the *mcrB* locus.

J. Bacteriol. 171 (1989a), S. 1974 - 1981

Ross, T. K.; Achberger, E. C. & Braymer, H. D.

Identification of a second polypeptide required for McrB restriction of 5-methylcytosine-containing DNA in *Escherichia coli* K12.

Mol. Gen. Genet. 216 (1989b), S. 402 - 407

Sain, B. & Murray, N. E.

The *hsd* (host specificity) genes of *E. coli* K 12.

Mol. Gen. Genet. 180 (1980), S. 35 - 46

Saha, S. & Rao, D. N.

Mutations in the Res subunit of the *Eco*PI restriction enzyme that affect ATP-dependent reactions.

J. Mol. Biol. 269 (1997), S. 342 - 354

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T.

Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2. Auflage (1989)

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sancar, A. & Hearst, J. E.

Molecular matchmakers.

Science 259 (1993), S. 1415 - 1420

Sanger, F. & Coulson, A. R.

A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.

J. Mol. Biol. 94 (1975), S. 441 - 448

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), S. 5463 - 5467

Schleif, R.

DNA looping.

Annu. Rev. Biochem. 61 (1992), S. 199 - 223

Schmidt, G.; Lenzen, C.; Simon, I.; Deuter, R.; Cool, R. H.; Goody, R. S. & Wittinghofer, A.

Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides.

Oncogene 12 (1996), S. 87 - 96

Sharrocks, A. D. & Hornby, D. P.

Transcription analysis of the restriction and modification genes of bacteriophage P1.

Mol. Microbiol. 5 (1991), S. 685 - 694

Simons, P. C. & Vander Jagt, D. L.

Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography.

Anal. Biochem. 82 (1977), S. 334 - 341

Singer, M. & Berg, P.

Genes & Genomes.

University Science Books, Kalifornien (1991)

deutsche Ausgabe *Gene und Genome*, Spektrum, Akad. Verlag (1992), S. 175 f.

Smith, D. B. & Johnson, K. S.

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.

Gene 67 (1988), S. 31 - 40

- Smith, D. B.;** Davern, K. M.; Board, P. G.; Tiu, W. U.; Garcia, E. G. & Mitchell, G. F.
M_r 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), S. 8703 - 8707
- Soberon, X.;** Covarrubias, L. & Bolivar, F.
Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325.
Gene 9 (1980), S. 287 - 305
- Spampinato, C. & Modrich, P.**
The MutL ATPase is required for mismatch repair.
J. Biol. Chem. 275 (2000), S. 9863 - 9869
- Stasiak, A.;** Tsaneva, I. R.; West, S. C.; Benson, C. J. B.; Yu, X. & Egelman, E. H.
The *Escherichia coli* RuvB Branch Migration Protein Forms Double Hexameric Rings Around DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), S. 7618 - 7622
- Stewart, F. J. & Raleigh, E. A.**
Dependence of McrBC cleavage on distance between recognition elements.
Biol. Chem. 379 (1998), S. 611 - 616
- Stewart, F. J.;** Panne, D.; Bickle, T. A. & Raleigh, E. A.
Methyl-specific DNA binding by McrBC, a modification-dependent restriction enzyme.
J. Mol. Biol. 298 (2000), S. 611 - 622
- Studier, F. W. & Bandyopadhyay, P. K.**
Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), S. 4677 - 4681
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A.**
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. 189 (1986), S. 113 - 130
- Studier, F. W.;** Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W.
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.
Methods Enzymol. 185 (1990), S. 60 - 89
- Su, P.;** Im, H.; Hsieh, H.; Kang'A, S & Dunn, N. W.
LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*.
Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999), S. 686 - 693
- Sugisaki, H. & Kanazawa, S.**
New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI).
Gene 16 (1981), S. 73 - 78

Suri, B.; Shepherd, J. C. & Bickle, T. A.

The *EcoA* restriction and modification system of *Escherichia coli* 15T-: enzyme structure and DNA recognition sequence.

EMBO J. 3 (1984), S. 575 - 579

Sutcliffe, J. G.

Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), S. 3737 - 3741

Sutcliffe, J. G.

Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43 Pt 1 (1979), S. 77 - 90

Sutherland, E.; Coe, L. & Raleigh, E. A.

McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease.

J. Mol. Biol. 225 (1992), S. 327 - 348

Szczelkun, M. D.; Dillingham, M. S.; Janscak, P.; Firman, K. & Halford, S. E.

Repercussions of DNA tracking by the type IC restriction endonuclease *EcoR124I* on linear, circular and catenated substrates.

EMBO J. 15 (1996), S. 6335 - 6347

Szczelkun, M. D.; Janscak, P.; Firman, K. & Halford, S. E.

Selection of non-specific DNA cleavage sites by the type IC restriction endonuclease *EcoR124I*.

J. Mol. Biol. 271 (1997), S. 112 - 123

Szybalski, W.; Kim, S. C.; Hasan, N. & Podhajaska, A. J.

Class-IIIS restriction enzymes - a review.

Gene 100 (1991), S. 13 - 26

Taylor, I.; Patel, J.; Firman, K. & Kneale, G. G.

Purification and biochemical characterization of the *EcoR124* type I modification methylase.

Nucleic Acids Res. 20 (1992), S. 179 - 186

Thielking, V.; Selent, U.; Kohler, E.; Wolfes, H.; Pieper, U.; Geiger, R.; Urbanke, C.; Winkler, F. K. & Pingoud, A.

Site-directed mutagenesis studies with *EcoRV* restriction endonuclease to identify regions involved in recognition and catalysis.

Biochemistry 30 (1991), S. 6416 - 6422

Thielking, V.; Selent, U.; Kohler, E.; Landgraf, A.; Wolfes, H., Alves, J. & Pingoud, A.

Mg²⁺ confers DNA binding specificity to the *EcoRV* restriction endonuclease.

Biochemistry 31 (1992), S. 3727 - 3732

Tomizawa, J. I.; Ohmori, H. & Bird, R. E.

Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (1977), S. 1865 - 1869

Topal, M. D. & Conrad, M.

Changing endonuclease *EcoRII* Tyr308 to Phe abolishes cleavage but not recognition: possible homology with the Int-family of recombinases.
Nucleic Acids Res. 21 (1993), S. 2599 - 2603

Topal, M. D.; Thresher, R. J.; Conrad, M. & Griffith, J.

NaeI endonuclease binding to pBR322 DNA induces looping.
Biochemistry 30 (1991), S. 2006 - 2010

Vale, R. D. & Milligan R. A.

The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins.
Science 288 (2000), S. 88 - 95

Venclovas, C.; Timinskas, A. & Siksny, V.

Five-stranded beta-sheet sandwiched with two alpha-helices: a structural link between restriction endonucleases *EcoRI* and *EcoRV*.
Proteins 20 (1994), S. 279 - 282

Wah, D. A.; Hirsch, J. A.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. & Aggarwal, A. K.

Structure of the multimodular endonuclease *FokI* bound to DNA.
Nature 388 (1997), S. 97 - 100

Wah, D. A.; Bitinaite, J.; Schildkraut, I. & Aggarwal, A. K.

Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), S. 10564 - 10569

Waite-Rees, P. A.; Diating, C. J.; Moran, L. S; Slatko, B. E.; Hornstra, L. J. & Benner, J. S.

Characterization and Expression of the *Escherichia coli* Mrr Restriction System
J. Bacteriol. 173 (1991), S. 5207 - 5219

Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, N. J. & Gay, N. J.

Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.
EMBO J. 1 (1982), S. 945 - 951

Walter J.; Noyer-Weidner M. & Trautner, T. A.

The amino acid sequence of the CCGG recognizing DNA methyltransferase *M.BsuFI*: implications for the analysis of sequence recognition by cytosine DNA methyltransferases.
EMBO J. 9 (1990), S. 1007 - 1013

Wang, J. C. & Giaever, G. N.

Action at a distance along a DNA.
Science 240 (1988), S. 300 - 304

Watson, N.

A new revision of the sequence of plasmid pBR322.
Gene 70 (1988), S. 399 - 403

- Watson, J. D. & Crick, F. H. C.**
Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribonucleic Acid.
Nature 171 (1953a), S. 737 f.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C.**
General Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid.
Nature 171 (1953b), S. 964 - 967
- Watson, M. A.; Gowers, D. M. & Halford, S. E.**
Alternative geometries of DNA looping: an analysis using the *Sfi*I endonuclease.
J. Mol. Biol. 298 (2000), S. 461 - 475
- Webb, J. L.; King, G.; Ternent, D.; Titheradge, A. J. & Murray, N. E.**
Restriction by *Eco*KI is enhanced by co-operative interactions between target sequences and is dependent on DEAD box motifs.
EMBO J. 15 (1996), S. 2003 - 2009
- Weijland, A.; Parlato, G. & Parmeggiani, A.**
Elongation factor Tu D138N, a mutant with modified substrate specificity, as a tool to study energy consumption in protein biosynthesis.
Biochemistry 33 (1994), S. 10711 - 10717
- Weiner, M. P.; Anderson, C.; Jerpseth, B.; Wells, S.; Johnson-Browne, B. & Vaillancourt, P.**
Studier pET System Vectors and Hosts.
STRATAGENE Newsletter 'Strategies', Vol. 7 (1994), S. 41 - 43
- Wende, W.**
Neue Strategien zur Expression und Aufreinigung von Nukleasen.
Dissertation (1995), Universität Hannover
- Wende, W.; Grindl, W.; Christ, F.; Pingoud, A. & Pingoud, V.**
Binding, bending and cleavage of DNA substrates by the homing endonuclease Pl-*Sce*I.
Nucleic Acids Res. 24 (1996), S. 4123 - 4132
- Wentzell, L. M.; Nobbs, T. J. & Halford, S. E.**
The *Sfi*I restriction endonuclease makes a four-strand DNA break at two copies of its recognition sequence.
J. Mol. Biol. 248 (1995), S. 581 - 595
- Willcock, D. F.; Dryden, D. T. & Murray, N. E.**
A mutational analysis of the two motifs common to adenine methyltransferases.
EMBO J. 13 (1994), S. 3902 - 3908
- Wilson, A. C.; Carlson, S. S. & White, T. J.**
Biochemical Evolution.
Annu. Rev. Biochem. 46 (1977), S. 573 - 639

- Wilson, A. C.; Ochman, H. & Prager, E. M.**
Molecular Timescale for Evolution.
Trends Genet. 3 (1987), S. 241 - 247
- Wilson, G. G.**
Organization of restriction-modification systems.
Nucleic Acids Res. 19 (1991), S. 2539 - 2566
- Wilson, G. G.**
Amino acid sequence arrangements of DNA-methyltransferases.
Methods Enzymol. 216 (1992), S. 259 - 279
- Wilson, G. G. & Murray, N. E.**
Restriction and modification systems.
Ann. Rev. Genet. 25 (1991), S. 585 - 627
- Wittinghofer, A. & Leberman, R.**
Elongation factor T from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. Purification and some properties of EF-Tu and EF-Ts from *Bacillus stearothermophilus*.
Eur. J. Biochem. 62 (1976), S. 373 - 382
- Woodcock, D. M.; Crowther, P. J.; Diver, W. P.; Graham, M.; Bateman, C.; Baker, D. J. & Smith, S. S.**
RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated *in vitro* with human DNA methyltransferase.
Nucleic Acids Res. 16 (1988), S. 4465 - 4482
- Woodcock, D. M.; Crowther, P. J.; Doherty, J.; Jefferson, S.; DeCruz, E.; Noyer-Weidner, M.; Smith, S. S.; Michael, M. Z. & Graham, M. W.**
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.
Nucleic Acids Res. 17 (1989), S. 3469 - 3478
- Wünsch, S.**
DNA-Bindung der Endonuklease McrBC aus Escherichia coli K12, charakterisiert durch footprint- und crosslink-Experimente.
Diplomarbeit (2000), Institut für Biochemie (FB Biologie), Universität Gießen
- Yang, W.**
Structure and function of mismatch repair proteins.
Mutation Res. 460 (2000), S. 245 - 256
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. & Messing, J.**
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
Gene 33 (1985), S. 103 - 119
- Yoon, H.; Suh, H.; Kim, K.; Han, M. H. & Yoo, O. J.**
The specificity and catalytic properties of *AluI* methylase.
Korean Biochem. J. 18 (1985), S. 88 - 93

- Young, M. C.; Kuhl, S. B. & von Hippel, P. H.**
Kinetic theory of ATP-driven translocases on one-dimensional polymer lattices.
J. Mol. Biol. 235 (1994), S. 1436 - 1446
- Yu, M.; Souaya, J. & Julin, D. A.**
Identification of the nuclease active site in the multifunctional RecBCD enzyme by creation of a chimeric enzyme.
J. Mol. Biol. 283 (1998), S.797 - 808
- Yuan, R.; Heywood, J. & Meselson, M.**
ATP hydrolysis by restriction endonuclease from *E.coli* K.
Nature 240 (1972), S. 42 - 43
- Yuan, R.; Hamilton, D. L. & Burckhardt, J.**
DNA translocation by the restriction enzyme from *E.coli* K.
Cell 20 (1980a), S. 237 - 244
- Yuan, R.; Hamilton, D. L.; Hadi, S. M & Bickle, T. A.**
Role of ATP in the cleavage mechanism of the *EcoP15* restriction endonuclease.
J. Mol. Biol. 144 (1980b), S. 501 - 519
- Yuan, R.**
Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases.
Ann. Rev. Biochem. 50 (1981), S. 285-319

VII. ANHANG

1. ORFs des *mcrBC*-Operons und Primärstrukturen der Genprodukte

Nachfolgend angegeben sind die genomische Basensequenz des *mcrBC*-Lokus aus der *immigration control region* von *Escherichia coli* K-12 und die Aminosäuresequenzen der sich daraus potenziell ergebenden Genprodukte. Die gezeigte Nukleotidsequenz entspricht der des codierenden Stranges des *HpaI-StuI*-Fragments nach Dila *et al.* (1990; *GenBank* Eintrag M58752) und besitzt die genomische Adresse 4 577 053 (Pos. 1 der gezeigten Sequenz) bis 4 574 349 (Pos. 2705) des *E.-coli*-Chromosoms.

Am linken Rand bezeichnet die angegebene Ziffer die Positionsnummer der ersten Base des in der gleichen Zeile stehenden Sequenzabschnitts. Die Startcodons der drei *mcrB*- bzw. *mcrBs*-ORFs sind durch Fettdruck hervorgehoben, das Stopcodon durch einen doppelten Unterstrich. Gleiches gilt auch für beide *mcrC*-ORFs und die beiden daraus potenziell entstehenden McrC-Genprodukte. Über der Basensequenz sind die aus der Translation der offenen Leseraster resultierenden Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code in kursiver Schrift angegeben, wobei die jeweils möglichen N-terminalen Aminosäuren unterstrichen sind. Der am linken Rand über der Positionsnummer stehende, fett hervorgehobene Buchstabe ordnet die in gleicher Zeile stehende Primärstruktur dem jeweils zugehörigen Protein-Typ zu (*B* steht für McrB bzw. McrB_s, *C* steht für McrC). *Hinweis:* Im Gegensatz zu *GenBank* verwendet SWISS-PROT seit Dezember 1998 das *zweite* Startcodon des *mcrB*-Gens für das McrB-Protein voller Länge (*Accession Number* P15005) und seit Oktober 1994 das *zweite* Startcodon des *mcrC*-Gens für McrC (*Accession Number* P15006, mit V = M in der gezeigten Primärstruktur). In der gezeigten Aminosäuresequenz der McrB-Proteine sind die drei GTP-Bindungsmotive zur Hervorhebung eingerahmt, wobei die konservierten Positionen durch Fettdruck markiert sind. Die Aminosäuresymbole des zweiten, potenziellen Motiv III der GTP-Bindung in McrB sind zur Hervorhebung durchgestrichen. In der gezeigten Aminosäuresequenz von McrC ist das diskutierte Leucinzipper-Motiv fett hervorgehoben, die Aminosäurereste des diskutierten katalytischen Motivs in McrC sind mit einem Rahmen markiert.

1 GTTAACCACC GGGAGCCTTC CACTGACTCA ATAGAACTT TCCCCCTCAG TAAATATTTA
 61 CCAGTCTGAT TTTGCAGTAA AAATCTATTG TTTCAGTACG TTGCGAAAGC GATAATAGAG
B M R K A Y L M E S I Q P W I E K F
 121 GCTTAGCAAT GAGGAAGGCA TATCTTATGG AATCTATTCA ACCCTGGATT GAAAAATTTA
B I K Q A Q Q Q R S Q S T K D Y P T S Y R
 181 TTAAGCAAGC ACAGCAACAA CGTTCGCAAT CCACTAAAGA TTATCCAACG TCTTACCGTA
B N L R V K L S F G Y G N F T S I P W F A
 241 ACCTGCGAGT AAAATTGAGT TTCGGTTATG GTAATTTTAC GTCTATTCCC TGGTTTGCAT
B F L G E G Q E A S N G I Y P V I L Y Y K
 301 TTCTTGAGAG AGGTCAGGAA GCTTCTAACG GTATATATCC CGTTATTCTC TATTATAAAG
B D F D E L V L A Y G I S D T N E P H A Q
 361 ATTTTGATGA GTTGGTTTTG GCTTATGGTA TAAGCGACAC GAATGAACCA CATGCCCAAT
B W Q F S S D I P K T I A E Y F Q A T S G
 421 GGCAGTTCTC TTCAGACATA CCTAAAACAA TCGCAGAGTA TTTTCAGGCA ACTTCGGGTG
B V Y P K K Y G Q S Y Y A C S Q K V S Q G
 481 TATATCCTAA AAAATACGGA CAGTCCTATT ACGCCTGTTC CCAAAAAGTC TCACAGGGTA
B I D Y T R F A S M L D N I I N D Y K L I
 541 TTGATTACAC CCGATTTGCC TCTATGCTGG ACAACATAAT CAACGACTAT AAATTAATAT
B F N S G K S V I P P M S K T E S Y C L E
 601 TTAATTCTGG CAAGAGTGTT ATCCACCTA **TG**TCAAAAAC TGAATCATAC TGTCTGGAAG
B D A L N D L F I P E T T I E T I L K R L
 661 ATGCGTTAAA TGATTTGTTT ATCCCTGAAA CCACAATAGA GACGATACTC AAACGATTAA
B T I K K N I I L Q **G P P G V G K T** F V A
 721 CCATCAAAAA AAATATTATC CTCCAGGGGC CGCCCGCGT TGGAAAAACC TTTGTTGCAC
B R R L A Y L L T G E K A P Q R V N M V Q
 781 GCCGTCTGGC TTACTTGCTG ACAGGAGAAA AGGCTCCGCA ACGCGTCAAT ATGGTTCAGT
B F H Q S Y S Y E D F I Q G Y R P N G V G
 841 TCCATCAATC TTATAGCTAT GAGGATTTTA TACAGGGCTA TCGTCCGAAT GGCCTCGGCT
B F R R K D G I F Y N F C Q Q A K E Q P E
 901 TCCGACGTAA AGACGGCATA TTTTACAATT TTTGTCAGCA AGCTAAAGAG CAGCCAGAGA
B K K Y I F I I D E I N R A N L S K V F G
 961 AAAAGTATAT TTTTATTATA GATGAAATCA ATCGTGCCAA TCTCAGTAAA GTATTTGGCG
B E V M M L M E H **D K R G** E N W S V P L T
 1021 AAGTGATGAT GTTAATGGAA CATGATAAAC GAGGTGAAAA CTGGTCTGTT CCCCTAACCT
B Y S E N D E E R F Y V P E N V Y I I G L
 1081 ACTCCGAAAA CGATGAAGAA CGATTCTATG TCCCGGAGAA TGT'TTATATC ATCGGTTTAA
B M **N T A D** R S L A V V D Y A L R R R F S
 1141 TGAATACTGC CGATCGCTCT CTGGCCGTTG TTGACTATGC CCTACGCAGA CGATTTTCTT
B F I D I E P G F D T P Q F R N F L L ~~N K~~
 1201 TCATAGATAT TGAGCCAGGT TTTGATACAC CACAGTTCCG GAATTTTTTA CTGAATAAAA
B ~~K A~~ E P S F V E S L C Q K M N E L N Q E
 1261 AAGCAGAACC TTCATTTGTT GAGTCTTTAT GCCAAAAAAT GAACGAGTTG AACCAGGAAA
B I S K E A T I L G K G F R I G H S Y F C
 1321 TCAGCAAAAGA GGCCACTATC CTTGGGAAAG GATTCGCAT TGGGCATAGT TACTTCTGCT
B C G L E D G T S P D T Q W L N E I V M T
 1381 GTGGGTTGGA AGATGGCACC TCTCCGATA CGCAATGGCT TAATGAAATT GTGATGACGG
B D I A P L L E E Y F F D D P Y K Q Q K W
C M D
 1441 ATATCGCCCC TTTACTCGAA GAATATTTCT TTGATGACCC CTATAAACAA CAGAA**ATGGA**

B T N K L L G D S *
C Q Q I I R G L I V E Q P V I P V R N I Y
1501 CCAACAAATT ATTAGGGGAC TCATAGTGGGA ACAGCCCGTG ATACCTGTCC GTAATATCTA
C Y M L T Y A W G Y L Q E I K Q A N L E A
1561 TTACATGCTT ACCTATGCAT GGGGTTATTT ACAGGAAATT AAGCAGGCAA ACCTTGAAGC
C I P G N N L L D I L G Y V L N K G V L Q
1621 CATACCCGGT AACAACTTTC TTGATATCCT GGGGTATGTA TTAAATAAAG GGGTTTTTACA
C L S R R G L E L D Y N P N T E I I P G I
1681 GCTTTCACGC CGAGGGCTTG AGCTTGATTA CAATCCTAAC ACCGAGATCA TTCCTGGCAT
C K G R I E F A K T I R G F H L N H G K T
1741 CAAAGGGCGA ATAGAGTTTG CTAAAACAAT ACGCGGCTTC CATCTTAATC ATGGGAAAAC
C V S T F D M L N E D T L A N R I I K S T
1801 CGTCAGTACT TTTGATATGC TTAATGAAGA CACGCTGGCT AACCGAATTA TAAAAGCAC
C L A I L I K H E K L N S T I R D E A R S
1861 ATTAGCCATA TTAATTAAGC ATGAAAAGTT AAATTCAACT ATCAGAGATG AAGCTCGTTC
C L Y R K L P G I S T L H L T P Q H F S Y
1921 ACTTTATAGA AAATTACCGG GCATTAGCAC TCTTCATTTA ACTCCGCAGC ATTTTCAGCTA
C L N G G K N T R Y Y K F V I S V C K F I
1981 TCTGAATGGC GGAAAAAATA CGCGTTATTA TAAATTCGTT ATCAGTGTCT GCAAATTCAT
C V N N S I P G Q N K G H Y R F Y D F E R
2041 CGTCAATAAT TCTATTCCAG GTCAAAACAA AGGACACTAC CGTTTCTATG ATTTTGAAG
C N E K E M S L L Y Q K F L Y E F C R R E
2101 AAACGAAAAA GAGATGTCAT TACTTTATCA AAAGTTTCTT TATGAATTTT GCCGTCGTGA
C L T S A N T T R S Y L K W D A S S I S D
2161 ATTAACGTCT GCAAACACAA CCCGCTCTTA TTTAAAATGG GATGCATCGA GTATATCGGA
C Q S L N L L P R M E T D I T I R S S E K
2221 TCAGTCACTT AATTTGTTAC CTCGAATGGA AACTGACATC ACCATTGCTC CATCAGAAAA
C I L I V D A K Y Y K S I F S R R M G T E
2281 AATACTTATC GTTGACGCCA AATACTATAA GAGCATTTTT TCACGACGAA TGGGAACAGA
C K F H S Q N L Y Q L M N Y L W S L K P E
2341 AAAATTTTCAT TCGCAAAATC TTTATCAACT GATGAATTAC TTATGGTCGT TAAAGCCTGA
C N G E N I G G L L I Y P H V D T A V K H
2401 AAATGGCGAA AACATAGGGG GGTATTAAT ATATCCCAC GTAGATACCG CAGTGAACA
C R Y K I N G F D I G L C T V N L G Q E W
2461 TCGTTATAAAA ATTAATGGCT TCGATATTGG CTTGTGTACC GTCAATTTAG GTCAGGAATG
C P C I H Q E L L D I F D E Y L K *
2521 GCCGTGTATA CATCAAGAAT TACTCGACAT TTTTCGATGAA TATCTCAAAT AAGCGGTAAG
2581 TTTTATAGAA AATACCGCTC CCGACACCAC ATCGGGAGCG GCTCATCATC AGGAGGCGAT
2641 CACCTCCACC AGCACATCCG TTGCCCAACT CTCTTCGCTG TTGGCGACAT TCCCTTCCTT
2701 GCAGG

2. Plasmid-Sequenzen

Nachfolgend angegeben sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren pBN211, pBN213 und pHisMcrBs sowie die der Substratplasmide pBW201, pMC63 und pMcrSb1. Auf die Darstellung der Sequenz des Expressionsvektors pBBImcrB wurde verzichtet, da die Sequenzierung dieses Plasmides nicht vollständig vorliegt. Die Substratplasmide pMcrSb2 und pMcrSb3 entsprechen in ihrer Sequenz dem hier gezeigten pMcrSb1, besitzen jedoch zusätzlich in dessen einziger Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI* die Sequenz des Oligodesoxynukleotids Sb61-11.11 (vgl. S. 134) in der im Kapitel *pMcrSb2 und pMcrSb3* (s. S. 128) beschriebenen Orientierung. Gleiches gilt für das Substratplasmid pBW201W, das in seiner Sequenz dem hier gezeigten pBW201 entspricht, jedoch zusätzlich in dessen einziger *EcoRI*-Schnittstelle die Sequenz von Sb61-11.11 besitzt. Nachfolgende Sequenzen sind in alphabetischer Reihenfolge der Plasmidbezeichnung zu finden.

2.1. pBN211

Nachstehend gezeigt ist die von U. Pieper (Gießen) erstellte Sequenz des von Krüger (1992) konstruierten Expressionsvektors für GST-McrB mit Thrombin-Spaltstelle, pBN211 (6405 bp).

Fett hervorgehoben ist das ATG-Startcodon (bei Pos. 258) für die Translation der Glutathion-S-Transferase (GST), die hier als 696 Aminosäuren umfassendes Fusionsprotein mit McrB exprimiert wird. Kursiv hervorgehoben ist die Sequenz, die mit Arg-Gly für eine Spaltstelle für Thrombin codiert. Unterstrichen sind die drei ATG-Startcodons für die Translation der drei McrB-Derivate McrB (bei Pos. 951 und Pos. 969) bzw. McrB_s (bei Pos. 1452) sowie die beiden Startcodons für die Translation von McrC (ATG bei Pos. 2318, GTG bei Pos. 2348), die aus dem *mcrBC*-Operon stammen. Durchgestrichen und fett hervorgehoben ist das TAG-Translationsstopcodon (bei Pos. 2346) von McrB bzw. McrB_s und somit hier von GST-McrB. Doppelt unterstrichen ist die erste (T, Pos. 945) und die letzte Base (A, Pos. 2397) des Ausschnitts vom *mcrBC*-Operon, der in den Expressionsvektor kloniert wurde. T (Pos. 945) ist die dritte Base der zur Klonierung verwendeten, aufgefüllten *EspI*-Schnittstelle (5'-GC↓TNAGC-3'), A (Pos. 2397) ist die erste Base der zur Klonierung verwendeten, polierten *NsiI*-Schnittstelle (5'-ATGCA↓T-3') des *mcrBC*-Operons.

Integrationsposition für das *EspI/NsiI*-Insert ist die *EcoRI*-Schnittstelle (5'-G↓AATTC-3') von pGEX-2T, die hier die stille T→A Mutation an Pos. 944 trägt (Generierung einer *SspI*-Schnittstelle 5'-AAT↓TAA-3').

```

1  ACGTTATCGA  CTGCACGGTG  CACCAATGCT  TCTGGCGTCA  GGCAGCCATC  GGAAGCTGTG
61  GTATGGCTGT  GCAGGTCGTA  AATCACTGCA  TAATTCGTGT  CGCTCAAGGC  GCACTCCCCT
121 TCTGGATAAT  GTTTTTTGCG  CCGACATCAT  AACGGTCTCG  GCAAATATTC  TGAATGAGC
181 TGTTGACAAT  TAATCATCGG  CTCGTATAAT  GTGTGGAATT  GTGAGCGGAT  AACAAATTC
241 CACAGGAAAC  AGTATTCATG  TCCCCTATAC  TAGGTTATTG  GAAAATTAAG  GGCCTTGTGC
301 AACCCACTCG  ACTTCTTTTG  GAATATCTTG  AAGAAAAATA  TGAAGAGCAT  TTGTATGAGC
361 GCGATGAAGG  TGATAAATGG  CGAAACAAAA  AGTTTGAATT  GGGTTTGGAG  TTTCCCAATC
421 TTCCTTATTA  TATTGATGGT  GATGTTAAAT  TAACACAGTC  TATGGCCATC  ATACGTTATA
481 TAGCTGACAA  GCACAACATG  TTGGGTGGTT  GTCCAAAAGA  GCGTGCAGAG  ATTTCAATGC
541 TTGAAGGAGC  GGTTTTGGAT  ATTAGATACG  GTGTTTCGAG  AATTGCATAT  AGTAAAGACT
601 TTGAAACTCT  CAAAGTTGAT  TTTCTTAGCA  AGCTACCTGA  AATGCTGAAA  ATGTTCGAAG
661 ATCGTTTATG  TCATAAAACA  TATTTAAATG  GTGATCATGT  AACCCATCCT  GACTTCATGT
721 TGTATGACGC  TCTTGATGTT  GTTTTATACA  TGGACCCAAT  GTGCCCTGGT  GCGTTCCCAA
781 AATTAGTTTG  TTTTAAAAAA  CGTATTGAAG  CTATCCCACA  AATTGATAAG  TACTTGAAAT
841 CCAGCAAGTA  TATAGCATGG  CTTTGCAGG  GCTGGCAAGC  CACGTTTGGT  GGTGGCGACC
901 ATCCTCCAAA  ATCGGATCTG  GTTCCGCGTG  GATCCCCGGG  AATATTAGCA  ATGAGGAAGG
961 CATATCTTAT  GGAATCTATT  CAACCCCTGA  TTGAAAAATT  TATTAAGCAA  GCACAGCAAC
1021 AACGTTTCGA  ATCCACTAAA  GATTATCCAA  CGTCTTACCG  TAACCTGCGA  GAAAAATTGA
1081 GTTTCGGTTA  TGGTAATTTT  ACGTCTATTC  CCTGGTTTGC  ATTTCTTGGG  GAAGGTCAGG
1141 AAGCTTCTAA  CGGTATATAT  CCCGTTATTC  TCTATTATAA  AGATTTTGAT  GAGTTGGTTT
1201 TGGCTTATGG  TATAAGCGAC  ACGAATGAAC  CACATGCCCC  ATGGCAGTTC  TCTTCAGACA
1261 TACCTAAAAC  AATCGCAGAG  TATTTTCAG  CAACTTCGGG  TGTATATCCT  AAAAAATACG
1321 GACATCCCTA  TTACGCCTGT  TCCCAAAAAG  TCTCACAGGG  TATTGATTAC  ACCCGATTTG
1381 CCTCTATGCT  TGACAACATA  ATCAACGACT  ATAAATTAAT  ATTTAATCTC  GGCAAGAGTG
1441 TTATTCCACC  TATGTCAAAA  ACTGAAATCAT  ACTGTCTGGA  AGATGCGTTA  AATGATTTGT
1501 TTATCCCTGA  AACCACAATA  GAGACGATAC  TCAAACGATT  AACCATCAAA  AAAAAATATTA
1561 TCCTCCAGGG  GCCGCCCGGC  GTTGAAAAAA  CCTTTGTTGC  ACGCCGTCTG  GCTTACTTGC
1621 TGACAGGAGA  AAAGGCTCCG  CAACGCGTCA  ATATGGTTCA  GTTCCATCAA  TCTTATAGCT
1681 ATGAGGATTT  TATACAGGGC  TATCGTCCGA  ATGGCGTCGG  CTTCCGACGT  AAAGACGGCA
1741 TATTTTACAA  TTTTGTGTCAG  CAAGCTAAAG  AGCAGCCAGA  GAAAAAGTAT  ATTTTATTA
1801 TAGATGAAAT  CAATCGTGCC  AATCTCAGTA  AAGTATTTGG  CGAAGTGATG  ATGTTAATGG
1861 AACATGATAA  ACGAGGTGAA  AACTGGTCTG  TTCCCCTAAC  CTACTCCGAA  AACGATGAAG
1921 AACGATTCTA  TGTCCCGGAG  AATGTTTATA  TCATCGTTTT  AATGAATACT  GCCGATCGCT
1981 CTCTGGCCGT  TGTTGACTAT  GCCCTACGCA  GACGATTTTC  TTTCATAGAT  ATTGAGCCAG
2041 GTTTTGATAC  ACCACAGTTC  CGGAATTTTT  TACTGAATAA  AAAAGCAGAA  CCTTCATTTG
2101 TTGAGTCTTT  ATGCCAAAAA  ATGAACGAGT  TGAACCAGGA  AATCAGCAA  GAGGCCACTA
2161 TCCTTGGGAA  AGGATTCGCG  ATTGGGCATA  GTTACTTCTG  CTGTGGGTTG  GAAGATGGCA
2221 CCTCTCCGGA  TACGCAATGG  CTTAATGAAA  TTGTGATGAC  GGATATCGCC  CCTTTACTCG
2281 AAGAATATTT  CTTTGATGAC  CCCTATAAAC  AACAGAAATG  GACCAACAAA  TTATTAGGGG
2341 ACTCATAGT  GAACAGCCCC  TGATACCTGT  CCGTAATATC  TATTACATGC  TTACCTAAAT
2401 TCATCGTGAC  TGACTGACGA  TCTGCCTCGC  GCGTTTTCGGT  GATGACGGTG  AAAACCTCTG
2461 ACACATGCAG  CTCCCGGAGA  CGGTCACAGC  TTGTCTGTAA  GCGGATGCCG  GGAGCAGACA
2521 AGCCCGTCAG  GGCGCGTCAG  CGGGTGTGG  CGGGTGTGCG  GGCGCAGCCA  TGACCCAGTC
2581 ACGTAGCGAT  AGCGGAGTGT  ATAATCTTG  AAGACGAAAG  GGCTCGTGA  TACGCCATT
2641 TTTATAGGTT  AATGTCATGA  TAATAATGGT  TTCTTAGACG  TCAGGTGGCA  CTTTTCGGGG
2701 AAATGTGCGC  GGAACCCCTA  TTTGTTTATT  TTTCTAAATA  CATTCAAATA  TGTATCCGCT
2761 CATGAGACAA  TAACCCTGAT  AAATGCTTCA  ATAATATTGA  AAAAGGAAGA  GTATGAGTAT
2821 TCAACATTT  CGTGTGCCC  TTATTCCTT  TTTTGCGGCA  TTTTGCCTTC  CTGTTTTTGC
2881 TCACCCAGAA  ACGCTGGTGA  AAGTAAAAGA  TGCTGAAGAT  CAGTTGGGTG  CACGAGTGGG
2941 TTACATCGAA  CTGGATCTCA  ACAGCGGTAA  GATCCTTGAG  AGTTTTCGCC  CCGAAGAACG
3001 TTTTCCAATG  ATGAGCACTT  TTAAAGTTCT  GCTATGTGGC  GCGGTATTAT  CCCGTGTTGA
3061 CGCCGGGCAA  GAGCAACTCG  GTCGCCGCAT  AACTATTCT  CAGAATGACT  TGTTGAGTA
3121 CTCACCAGTC  ACAGAAAAGC  ATCTTACGGA  TGGCATGACA  GTAAGAGAAT  TATGCAGTGC

```

3181 TGCCATAACC ATGAGTGATA ACACTGCGGC CAACTTACTT CTGACAACGA TCGGAGGACC
3241 GAAGGAGCTA ACCGCTTTTT TGCACAACAT GGGGGATCAT GTAAC TCGCC TTGATCGTTG
3301 GGAACCGGAG CTGAATGAAG CCATACCAAA CGACGAGCGT GACACCACGA TGCCTGCAGC
3361 AATGGCAACA ACGTTGCGCA AACTATTAAC TGGCGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCGGCA
3421 ACAATTAATA GACTGGATGG AGGCGGATAA AGTTGCAGGA CCACTTCTGC GCTCGGCCCT
3481 TCCGGCTGGC TGGTTTATTG CTGATAAAATC TGGAGCCGGT GAGCGTGGGT CTCGCGGTAT
3541 CATTGCAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC CTCCTGATC GTAGTTATCT ACACGACGGG
3601 GAGTCAGGCA ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT
3661 TAAGCATTGG TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAAC T
3721 TCATTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT
3781 CCCTTAACGT GAGTTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC
3841 TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGC GCGTAA CTGCTGCTTG CAAACAAAA AACCAACCGCT
3901 ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACGGT
3961 CTTCAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA
4021 CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC
4081 TGCTGCCAGT GGCGATAAGT CGTGCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA
4141 TAAGGCGCAG CGGTGCGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCAGCT TGGAGCGAAC
4201 GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCTATGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA
4261 AGGGAGAAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAA GCGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG
4321 GGAGCTTCCA GGGGAAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCC TCGGGTTTC GCCACCTCTG
4381 ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG
4441 CAACGCGGCC TTTTTACGGT TCCTGGCCT TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTTCCTTCC
4501 TGCGTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGC
4561 TCGCCGAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA GTCAGTGAGC GAGGAAGCGG AAGAGCGCCT
4621 GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA CACCGCATAA ATTCCGACAC
4681 CATCGAATGG TGCAAAAACCT TTCGCGGTAT GGCATGATAG CGCCGGAAG AGAGTCAATT
4741 CAGGGTGGTG AATGTGAAAC CAGTAACGTT ATACGATGTC GCAGAGTATG CCGGTGTCTC
4801 TTATCAGACC GTTTCGCGG TGGTGAACCA GGCCAGCCAC GTTCTGCGA AAACGCGGGA
4861 AAAAGTGGAA GCGGCGATGG CGGAGCTGAA TTACATTC C AACCGCTGG CACAACAAC T
4921 GCGGGGAAA CAGTCGTTGC TGATTGCGGT TGCCACCTCC AGTCTGGCCC TGCACGCCC
4981 GTCGCAAATT GTCGCGGCGA TTAATCTCG CGCCGATCAA CTGGGTGCCA GCGTGGTGGT
5041 GTCGATGGTA GAACGAAGCG GCGTCAAGC CTGTAAAGCG GCGGTGCACA ATCTTCTCGC
5101 GCAACGCGTC AGTGGGCTGA TCATTAAC TA TCCGCTGGAT GACCAGGATG CCATTGCTGT
5161 GGAAGCTGCC TGCACTAATG TTCCGGCGTT ATTTCTTGAT GTCTCTGACC AGACACCCAT
5221 CAACAGTATT ATTTTCTCCC ATGAAGACGG TACGCGACTG GGCGTGGAGC ATCTGGTCCG
5281 ATTGGGTCAC CAGCAAATCG CGCTGTTAGC GGGCCCATTA AGTCTGTCT CCGCGCGTCT
5341 GCGTCTGGCT GGCTGGCATA AATATCTCAC TCGCAATCAA ATTCAGCCGA TAGCGGAACG
5401 GGAAGGCGAC TGGAGTGCCA TGTCCGTTT TCAACAAACC ATGCAAATGC TGAATGAGGG
5461 CATCGTTCCC ACTGCGATGC TGGTTGCCAA CGATCAGATG GCGCTGGGCG CAATGCGCGC
5521 CATTACCGAG TCCGGGCTGC GCGTTGGTGC GGATATCTCG GTAGTGGGAT ACGACGATAC
5581 CGAAGACAGC TCATGTTATA TCCCGCCGTT AACCACCATC AAACAGGATT TTCGCTTGCT
5641 GGGGCAAAAC AGCGTGGACC GCTTGCTGCA ACTCTCTCAG GGCCAGGCGG TGAAGGGCAA
5701 TCAGCTGTTG CCCGTCTCAC TGGTGA AAAAG AAAAACCACC CTGGCGCCCA ATACGCAAAC
5761 CGCTCTCCC CGCGCGTTGG CCGATTCAAT AATGCAGCTG GCACGACAGG TTTCCCGACT
5821 GGAAAGCGGG CAGTGAGCGC AACGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT TAGGCACCCC
5881 AGGCTTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTGTGTGG AATGTGAGC GGATAACAAT
5941 TTCACACAG AAAACAGCTAT GACCATGATT ACGGATTCAC TGGCCGTCGT TTTACAACGT
6001 CGTGACTGG AAAACCCCTGG CGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCCTTTC
6061 GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCGCAGC
6121 CTGAATGGCG AATGGCGCTT TGCTGGTTTT CCGGCACCAG AAGCGGTGCC GGAAAGCTGG
6181 CTGGAGTGCG ATCTTCTCTGA GGCCGATACT GTCGTCTGTC CTTCAAAC TG GCAGATGCAC
6241 GGTTACGATG CGCCCATCTA CACCAACGTA ACCATATCCCA TTACGGTCAA TCCGCGTTTT
6301 GTTCCCACGG AGAATCCGAC GGGTTGTTAC TCGCTCACAT TTAATGTTGA TGAAAGCTGG
6361 CTACAGGAAG GCCAGACGCG AATTATTTTT GATGGCGTTG GAATT

2.2. pBN213

Gezeigt ist die von U. Pieper (Gießen) erstellte Sequenz des von Krüger (1992) konstruierten Expressionsvektors für GST-McrC mit Faktor X_a-Spaltstelle, pBN213 (6159 bp).

Fett hervorgehoben ist das ATG-Startcodon (bei Pos. 258) für die Translation der Glutathion-S-Transferase (GST), die hier als 585 Aminosäuren umfassendes Fusionsprotein mit McrC exprimiert wird. Unterstrichen ist das GTG-Startcodon (bei Pos. 969) für die Translation von McrC, das aus dem *mcrBC*-Operon stammt (das erste ATG-Startcodon des Operons für die Translation von McrC ist durch die Klonierung entfernt). Durchgestrichen und fett hervorgehoben ist das TAA-Translationsstopcodon (bei Pos. 2013) von McrC und somit hier von GST-McrC. Doppelt unterstrichen ist die erste (G, Pos. 942) und die letzte Base (G, Pos. 2148) des Ausschnitts vom *mcrBC*-Operon, der in den Expressionsvektor kloniert wurde; G (Pos. 942) ist die vierte Base der zur Klonierung verwendeten, aufgefüllten *AvaII*-Schnittstelle (5'-G↓GWCC-3'), G (Pos. 2148) ist die erste Base der zur Klonierung verwendeten *StuI*-Schnittstelle (5'-AGG↓CCT-3') des *mcrBC*-Operons. Integrationsposition für das *AvaII/StuI*-Insert ist die *SmaI*-Schnittstelle (5'-CCC↓GGG-3') von pGEX-3T.

```

1  ACGTTATCGA  CTGCACGGTG  CACCAATGCT  TCTGGCGTCA  GGCAGCCATC  GGAAGCTGTG
61  GTATGGCTGT  GCAGGTCGTA  AATCACTGCA  TAATTCGTGT  CGCTCAAGGC  GCACTCCCCT
121  TCTGGATAAT  GTTTTTTGCG  CCGACATCAT  AACGGTTCTG  GCAAATATTC  TGAATGAGC
181  TGTTGACAAT  TAATCATCGG  CTCGTATAAT  GTGTGGAATT  GTGAGCGGAT  AACAAATTC
241  CACAGGAAAC  AGTATTCATG  TCCCCTATAC  TAGGTTATTG  GAAAATTAAG  GGCCTTGTGC
301  AACCCACTCG  ACTTCTTTTG  GAATATCTTG  AAGAAAAATA  TGAAGAGCAT  TTGTATGAGC
361  GCGATGAAGG  TGATAAATGG  CGAAACAAAA  AGTTTGAATT  GGGTTTGGAG  TTTCCCAATC
421  TTCCTTATTA  TATTGATGGT  GATGTTAAAT  TAACACAGTC  TATGGCCATC  ATACGTTATA
481  TAGCTGACAA  GCACAACATG  TTGGGTGGTT  GTCCAAAAGA  GCGTGCAGAG  ATTTCAATGC
541  TTGAAGGAGC  GGTTTTGGAT  ATTAGATACG  GTGTTTCGAG  AATTGCATAT  AGTAAAGACT
601  TTGAAACTCT  CAAAGTTGAT  TTTCTTAGCA  AGCTACCTGA  AATGCTGAAA  ATGTTCGAAG
661  ATCGTTTATG  TCATAAAACA  TATTTAAATG  GTGATCATGT  AACCCTCCCT  GACTTCATGT
721  TGTATGACGC  TCTTGATGTT  GTTTTATACA  TGGACCCAAT  GTGCCCTGGAT  GCGTTCCCAA
781  AATTAGTTTG  TTTTAAAAAA  CGTATTGAAG  CTATCCCACA  AATTGATAAG  TACTTGAAAT
841  CCAGCAAGTA  TATAGCATGG  CCTTTGCAGG  GCTGGCAAGC  CACGTTTGGT  GGTGGCGACC
901  ATCCTCCAAA  ATCGGATCTG  ATCGAAGGTC  GTGGGATCCC  CGACCAACAA  ATTATTAGGG
961  GACTCATAGT  GGAACAGCCC  GTGATACCTG  TCCGTAATAT  CTATTACATG  CTTACCTATG
1021  CATGGGGTTA  TTTACAGGAA  ATTAAGCAGG  CAAACCTTGA  AGCCATACCC  GGTAACAATC
1081  TTCTTGATAT  CCTGGGGTAT  GTATTAATAA  AAGGGGTTTT  ACAGCTTTCA  CGCCGAGGGC
1141  TTGAGCTTGA  TTACAATCCT  AACACCGAGA  TCATTCCCTG  CATCAAAGGG  CGAATAGAGT
1201  TTGCTAAAAA  AATACGCGGC  TTCCATCTTA  ATCATGGGAA  AACCCTCAGT  ACTTTTGATA
1261  TGCTTAATGA  AGACACGCTG  GCTAACCAGG  TTATAAAAAG  CACATTAGCC  ATATTAATTA
1321  AGCATGAAAA  GTTAAATTC  ACTATCAGAG  ATGAAGCTCG  TTCACTTTAT  AGAAAATTAC
1381  CGGGCATTAG  CACTCTTCAT  TTAACCTCCG  AGCATTTTCA  CTATCTGAAT  GGCGGAAAAA
1441  ATACGCGTTA  TTATAAATTC  GTTATCAGTG  TCTGCAAATT  CATCGTCAAT  AATTCATATC
1501  CAGGTCAAAA  CAAAGGACAC  TACCGTTTCT  ATGATTTTGA  AAGAAACGAA  AAAGAGATGT

```


1561 CATTACTTTA TCAAAAGTTT CTTTATGAAT TTTGCCGTCG TGAATTAACG TCTGCAAACA
 1621 CAACCCGCTC TTATTTAAAA TGGGATGCAT CGAGTATATC GGATCAGTCA CTTAATTTGT
 1681 TACCTCGAAT GGAAACTGAC ATCACCATTC GCTCATCAGA AAAAATACTT ATCGTTGACG
 1741 CCAAATACTA TAAGAGCATT TTTTCACGAC GAATGGGAAC AGAAAAATTT CATTCGCAAA
 1801 ATCTTTATCA ACTGATGAAT TACTTATGGT CGTTAAAGCC TGAAAATGGC GAAAACATAG
 1861 GGGGGTTATT AATATATCCC CACGTAGATA CCGCAGTGAA ACATCGTTAT AAAATTAATG
 1921 GCTTCGATAT TGGCTTGTGT ACCGTCAATT TAGGTCAGGA ATGGCCGTGT ATACATCAAG
 1981 AATTACTCGA CATTFTCGAT GAATATCTCA ~~AATA~~GCGGT AAGTTTTATA GAAAATACCG
 2041 CTCCCGACAC CACATCGGGA GCGGCTCATC ATCAGGAGGC GATCACCTCC ACCAGCACAT
 2101 CCGTTGCCCA ACTCTCTTCG CTGTTGGCGA CATTCCTTC CTTGCAGGGG GAATTCATCG
 2161 TGA CTGACTG ACGATCTGCC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT
 2221 GCAGCTCCC GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
 2281 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCAGCTAG
 2341 CGATAGCGGA GTGTATAATT CTGAAGACG AAAGGCCTC GTGATACGCC TATTTTTATA
 2401 GGTAAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT GGCATTTTTC GGGGAAATGT
 2461 GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG
 2521 ACAATAACCC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA GTATTCAACA
 2581 TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CCTTTTTTGC GGCATTTTTG CTTCTGTGTT TTGCTCACCC
 2641 AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG TGGGTTACAT
 2701 CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG AACGTTTTCC
 2761 AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCCGTG TTGACGCCGG
 2821 GCAAGAGCAA CTCGGTCGCC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG AGTACTCACC
 2881 AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA GTGCTGCCAT
 2941 AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG GACCGAAGGA
 3001 GCTAACCGCT TTTTTGCACA ACATGGGGGA TCATGTAACT CGCCTTGATC GTTGGGAACC
 3061 GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCCGT CAGCAATGGC
 3121 AACAACTGTC CGCAAACTAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC GGCAACAATT
 3181 AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCCTT CTGCGCTCGG CCCTTCCGGC
 3241 TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CCGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATGTC
 3301 AGCATGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCC TATCGTAGTT ATCTACACGA CGGGAGTCA
 3361 GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCCTCAC TGATTAAGCA
 3421 TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACTTCATTT
 3481 TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA
 3541 ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG GATCTTCTTG
 3601 AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC
 3661 GGTGGTTTTG TTGCCGGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG
 3721 CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA
 3781 GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC
 3841 CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA CGATAGTTAC CGGATAAGGC
 3901 GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA
 3961 CACCGAACTG AGATACTTAC AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG
 4021 AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCCGAAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
 4081 TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCGTGTCGGG TTTGCGCCACC TCTGACTTGA
 4141 GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG CCAGCAACGC
 4201 GGCTTTTTTA CGGTTCCTGG CCTTTTGTCT GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCTGCGTT
 4261 ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTCGCCG
 4321 CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCTGATGCG
 4381 GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATAAATTCGG ACACCATCGA
 4441 ATGGTGCAAA ACCTTTCGCG GTATGGCATG ATAGCGCCCG GAAGAGAGTC AATTCAGGGT
 4501 GGTGAATGTG AAACCAGTAA CGTTATACGA TGTGCGCAGAG TATGCCGGTG TCTCTTATCA
 4561 GACCGTTTCC CGCGTGGTGA ACCAGGCCAG CCACGTTTCT GCGAAAACGC GGGAAAAAGT
 4621 GGAAGCGGCG ATGGCGGAGC TGAATTACAT TCCCAACCGC GTGGCACAAC AACTGGCGGG
 4681 CAAACAGTCG TTGCTGATTG GCGTTGCCAC CTCCAGTCTG GCCCTGCACG CGCCGTCGCA
 4741 AATTGTCGCG GCGATTAAAT CTCGCGCCGA TCAACTGGGT GCCAGCGTGG TGGTGTGAT
 4801 GGTAGAACGA AGCGGCGTCG AAGCCTGTAA AGCGGCGGTG CACAATCTTC TCGCGCAACG
 4861 CGTCAGTGGG CTGATCATTA ACTATCCGCT GGATGACCAG GATGCCATTG CTGTGGAAGC
 4921 TGCCCTGCACT AATGTTCGGG CGTTATTTCT TGATGTCTCT GACCAGACAC CCATCAACAG
 4981 TATTATTTTC TCCCATGAAG ACGGTACGCG ACTGGGCGTG GAGCATCTGG TCGCATTGGG
 5041 TCACCAGCAA ATCGCGCTGT TAGCGGGCCC ATTAAGTTCT GTCTCGGCGC GTCTGCGTCT
 5101 GGCTGGCTGG CATAAATATC TCACTCGCAA TCAAATTCAG CCGATAGCGG AACGGGAAGG
 5161 CGACTGGAGT GCCATGTCCG GTTTTCAACA AACCATGCAA ATGCTGAATG AGGGCATCGT

```

5221 TCCCACTGCG ATGCTGGTTG CCAACGATCA GATGGCGCTG GCGCAATGC GCGCCATTAC
5281 CGAGTCCGGG CTGCGCGTTG GTGCGGATAT CTCGGTAGTG GGATACGACG ATACCGAAGA
5341 CAGCTCATGT TATATCCCGC CGTTAACCAC CATCAAACAG GATTTTCGCC TGCTGGGGCA
5401 AACCAGCGTG GACCGCTTGC TGCAACTCTC TCAGGGCCAG GCGGTGAAGG GCAATCAGCT
5461 GTTGCCCGTC TCACTGGTGA AAAGAAAAAC CACCCTGGCG CCCAATACGC AAACCGCCTC
5521 TCCCCGCGCG TTGGCCGATT CATTAATGCA GCTGGCACGA CAGGTTTCCC GACTGGAAG
5581 CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCAGGCTT
5641 TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTACA
5701 CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT TCACTGGCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC
5761 TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG CACATCCCCC TTTCCGCCAGC
5821 TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT
5881 GGCGAATGGC GCTTTGCCTG GTTTCGGCA CCAGAAGCGG TGCCGGAAAG CTGGCTGGAG
5941 TGCGATCTTC CTGAGGCCGA TACTGTCGTC GTCCCTCAA ACTGGCAGAT GCACGGTTAC
6001 GATGCGCCCA TCTACACCAA CGTAACCTAT CCCATTACG TCAATCCGCC GTTTGTTCCC
6061 ACGGAGAAATC CGACGGGTTG TTACTCGCTC ACATTTAATG TTGATGAAAG CTGGCTACAG
6121 GAAGGCCAGA CGCGAATTAT TTTTGATGGC GTTGAATT

```

2.3. pBW201

Nachstehend angegeben ist die Sequenz des als Spaltssubstrat für das McrBC-Restriktionssystem verwendete bzw. als *template* für die Generierung von Spaltssubstraten durch die PCR-Methode dienenden Plasmids pBW201 (4853 bp). Die Angabe der Sequenz beruht auf einer persönlichen Mitteilung von T. Krüger (*MPI für Molekulare Genetik*, Berlin) und wurde durch eigene Ergebnisse von Sequenzierungen berichtigt (G→C an Pos. 4826; Insertion der Sequenz 5'-CCAAAATGAA-3' nach Pos. 4842).

Fett hervorgehoben (Pos. 3331 bis Pos. 4560) ist das *hsmFI*-Gen aus *Bacillus subtilis* (NCBI *GenBank* Registrierungsnummer X51515), das für die DNA-Methyltransferase *M.BsuFI* (SWISS-PROT Registrierungsnummer P17044) codiert. *M.BsuFI* methyliert die Sequenz 5'-CCGG-3' zu 5'-MCGG-3' (M = 5-Methylcytosin). Kursiv hervorgehoben sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3', bei Pos. 1) und *AsuII* (5'-TT↓CGAA-3', bei Pos. 424), die für die Generierung von pMcrSb1 aus pBW201 verwendet wurden. Die genannte *EcoRI*-Schnittstelle wurde des Weiteren auch zur Generierung von pBW201W durch Insertion von Sb61-11.11 in pBW201 verwendet.

```

1  GAATTCCGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG GATAAACTT
61 GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT
121 ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA
181 TATATCAACG GTGGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA
241 AAATCTCGAT AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTTATTAT GGTGAAAGTT
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC AGGGCTTCCC
361 GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT
421 TTATTCGAAG ACGAAAAGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA
481 TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCTATTT

```

541 GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA
 601 TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA
 661 TTCCCTTTTT TCGGCATT TGCCTTCCTG TTTTTGCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG
 721 TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA
 781 GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA
 841 AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC
 901 GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC
 961 TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA
 1021 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC
 1081 ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA
 1141 TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGCAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC
 1201 TATTAACCTG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG
 1261 CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG
 1321 ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC CCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG
 1381 GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC
 1441 GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCC TACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC
 1501 AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACCTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT
 1561 AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC
 1621 ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGTC
 1681 GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTCGCCGG
 1741 ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA
 1801 ATACTGTCTT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCCTT CAAGAATCTT GTAGCACCAG
 1861 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCTGTATC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCTG
 1921 GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA
 1981 CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC
 2041 TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC
 2101 CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GAAAACGCCT
 2161 GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGTAT
 2221 GCTCGTCAGG GGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCGGA GATGCGCCGC
 2281 GTGCGGCTGC TGGAGATGGC GGACGCGATG GATATGTTCT GCCAAGGGTT GATTTGCGCA
 2341 TTACACGTTC TCCGCAAGAA TTGATTGGCT CCAATTCCTG GAGTGGTGAA TCCGTTAGCG
 2401 AGGTGCCGCC GGCTTCCATT CAGGTCGAGG TGGCCCGGCT CCATGCACCG CGACGCAACG
 2461 CGGGGAGGCA GACAAGGTAT AGGGCGGCGC CTACAATCCA TGCCAACCCG TTCCATGTGC
 2521 TCGCCGAGGC GGCATAAATC GCCGTGACGA TCAGCGGTCC AGTGATCGAA GTTAGGCTGG
 2581 TAAGAGCCGC GAGCGATCCT TGAAGCTGTC CCTGATGGTC GTCATCTACC TGCCTGGACA
 2641 GCATGGCCTG CAACGCGGGC ATCCCGATGC CGCCGGAAGC GAGAAGAATC ATAATGGGGA
 2701 AGGCCATCCA GCCTCGCGTC GCGAACGCCA GCAAGACGTA GCCCAGCGCG TCGGCCGCCA
 2761 TGCCGGCGAT AATGGCCTGC TTCTCGCCGA AACGTTTGGT GGCGGGACCA GTGACGAAGG
 2821 CTTGAGCGAG GCGGTGCAAG ATTCCGAATA CCGCAAGCGA CAGGCCGATC ATCGTCCGCG
 2881 TCCAGCGAAA GCGGTCCCTG CCGAAAATGA CCCAGAGCGC TGCCGGCACC TGTCCTACGA
 2941 GTTGCATGAT AAAGAAGACA GTCATAAGTG CGGCGACGAT AGTCATGCC CGCGCCACC
 3001 GGAAGGAGCT GACTGGGTTG AAGGCTCTCA AGGGCATCGG TCGACTGTAT AATAGTGTG
 3061 TGGGGTTGTG TTGACAGATT AGATAACTTC GTGGGGGTGT GGAGATAGGA TGGATGTGGC
 3121 TTTCTTGAGA AGTTGTTTAA ATTCTAATAT CGAGGTGATG TTATGTTAAA TAGAATGTTA
 3181 AAAGCAAGTG CAAGGTTATT TTTACGAAAA TAAAAAGTA AGCACTACGT ATCAATATTG
 3241 AAATATACGG ACGTTTTCGT TTTTGGGGT TATAATTCAA ATTAATAGTG CTATAATTTT
 3301 CGTATAATAT TAAGATAAAA GGTGATTGCA ATGCGTGGTG GAAATCGACT CCGTGCAGGA
 3361 **AGGAAGGTTA TTCTGAGTC AGAAAAAAG AAAAGAAAA GCGTGTATAT TACAGATAAA**
 3421 **CTTTACTACTA GAATTATGGA TACTGACATC GAAAAATGCA ATAATTTTCTAG TCAAAAATGT**
 3481 **ATGGCATTGA TTGAATTAGC AATGGAAAAAT CTAAATAAGA ACAATCAAGA GCATAGTGTG**
 3541 **AAAAGGAACA ATATATTGAT GGTGAGAGAT ACCAAATCTA CATAACAACA AACGAATAAT**
 3601 **AATTTTAAAA AACAAAACCG TGAATAAAAA TTGACATTTA TTGATTTATT CGCTGGTATT**
 3661 **GGAGGAATTA GATTAGGATT TGAAGACAAA TATACGAAAT GTGTATTTAG TTCTGAATGG**
 3721 **GATAAATATG CAGCTCAAAC GTATGAAGCT AATTATGGTG AGAAGCCTCA TGGTGTATTT**
 3781 **ACAAAAATCA ACGAAAATGA TATTCCAGAT CAAGATGTTT TATTGGCTGG ATTTCTTTGT**
 3841 **CAGCCGTTTA GCAATATAGG CAAGCGTGAA GGTTTTGTCT ATGAAAGAAG GAACATTATT**
 3901 **TTTGATGTTT TTAGGATCCT AAAGAAAAAG CAACCTAAGA TGTTTTTGTG GAAAAATGTA**
 3961 **AAAGGGCTTT TAACAAAATGA TAATGGGAAT ACATTTTCGAG TCATTTTAGA CAATCTTAAG**
 4021 **AGTCTAGGAT ATTCCGTTTT TTATGAAGTT ATGGATGCAC AAAATTTTGG GCTTCCACAA**
 4081 **AGACGTGAAC GTATTGTAAT TGTGGGATTT CATCTGATT TAGGCATTA TGATTTTCTA**
 4141 **TTTCTTAAAG GTAATCCTGA CAATAAGGTT CCAATTAATG CTATTTTAGA GCATAATCCT**

```

4201 ACAGGGTATT CAATTTCCAA GCGTTTGCAA GAAAGTTACT TATTTAAAAA GGATGATGGG
4261 AAGCCACAGA TTGTTGATTT TAGATGCACA TATCAAGTTA ACACTTTAGT AGCTAGTTAT
4321 CACAAAATAC AGCGTCTTAC AGGAACATTT GTAAAAGACG GAGAAACAGG GCTTCGATTA
4381 TTCAGCGAAT TAGAACTGAA ACGTTTGATG GGTTTCCCTG TTGATTTTAA AGTTCCTGTG
4441 TCAAGAACAC AAATGTATAG GCAGTTTGGG AATTCGTGTTG CTGTTCCCAT GATTAAAGCT
4501 GTTGCAGGAG CAATGAAAGA GCGACTTTTG TTGGCTGAAA TGCAGGTATT GAAAAAATAA
4561 AAACATATAGC TTTATAACTA ATATAGAGAC TAATATCAGC AAGTATAGTT TGCTGATATT
4621 AGTCTTTTTGC TTTAATTGTT TGAAAAACCT TTAATCTGTA TTTTTTGACC ACGCTTTTTG
4681 CTTGGATAAG TCCATTTAAA AGGAGTTCCA AATTGTCTTT TTCCACTATA TTCTTCGATG
4741 TAATGTTTTAA TATAATCATC ACGATTCCAA ACAGCAAATT TATTTGTAAA TATAATTTAA
4801 TCTACCATTT GTATCTTGTC ATTGACTAAA GGGCTATGTA AACCAAAAAT GAA

```

2.4. pHisMcrBs

Nachstehend gezeigt ist die auf der Basis von Angaben von U. Pieper (Gießen) erstellte Sequenz des Expressionsvektors für His₆-McrB_s, pHisMcrBs (4596 bp).

Fett hervorgehoben ist das ATG-Startcodon (bei Pos. 1) für die Translation des 306 Aminosäurereste großen His₆-McrB_s-Fusionsproteins. Unterstrichen sind die beiden Startcodons für die Translation von McrC (ATG bei Pos. 891, GTG bei Pos. 921), die aus dem *mcrBC*-Operon stammen. Durchgestrichen und fett hervorgehoben ist das TAG-Translationsstopcodon (bei Pos. 919) von McrB_s und somit hier von GST-McrB. Doppelt unterstrichen sind die erste (G, Pos. 23) und die letzte Base (G, Pos. 1250) des Ausschnitts vom *mcrBC*-Operon, der in den Expressionsvektor kloniert wurde; G (Pos. 23) ist die erste Base der zur Klonierung verwendeten *Bam*HI-Schnittstelle (5'-G↓GATCC-3'), G (Pos. 1250) ist die erste Base der zur Klonierung erzeugten *Sal*I-Schnittstelle (5'-G↓TCGAC-3') des letztlich auf dem *mcrBC*-Operon basierenden PCR-Produktes. Integrationsort für das *Bam*HI/*Sal*I-Insert ist ein *Bam*HI/*Sal*I-Rahmen aus pHisRV.

```

1  ATGCATCATC ATCACCATCA CGGATCCTCA AAAACTGAAT CATACTGTCT GGAAGATGCG
61 TTAAATGATT TGTTTATCCC TGAAACCACA ATAGAGACGA TACTCAAACG ATTAACCATC
121 AAAAAAATA TTATCCTCCA GGGGCCGCC GGCCTTGGAA AAACCTTTGT TGCACGCCGT
181 CTGGCTTACT TGCTGACAGG AGAAAAGGCT CCGCAACGCG TCAATATGGT TCAGTTCCAT
241 CAATCTTATA GCTATGAGGA TTTTATACAG GGCTATCGTC CGAATGGCGT CGGCTTCCGA
301 CGTAAAGACG GCATATTTTA CAATTTTTGT CAGCAAGCTA AAGAGCAGCC AGAGAAAAG
361 TATATTTTTA TTATAGATGA AATCAATCGT GCCAATCTCA GTAAAGTATT TGGCGAAGTG
421 ATGATGTTAA TGGAACATGA TAAACGAGGT GAAACTGGT CTGTTCCCTT AACCTACTCC
481 GAAAACGATG AAGAACGATT CTATGTCCC GAGAATGTTT ATATCATCGG TTTAATGAAT
541 ACTGCCGATC GCTCTCTGGC CGTTGTTGAC TATGCCCTAC GCAGACGATT TTCTTTTATA
601 GATATTGAGC CAGGTTTTGA TACACCACAG TTCCGGAATT TTTTACTGAA TAAAAAAGCA
661 GAACCTTCAT TTGTTGAGTC TTTATGCCAA AAAATGAACG AGTTGAACCA GGAAATCAGC
721 AAAGAGGCCA CTATCCTTGG GAAAGGATTC CGCATTTGGC ATAGTTACTT CTGCTGTGGG
781 TTGGAAGATG GCACCTCTCC GGATACGCAA TGGCTTAATG AAATTTGTAT GACGGATATC
841 GCCCCTTTAC TCGAAGAATA TTTCTTTGAT GACCCCTATA AACAACAGAA ATGGACCAAC
901 AAATTATTAG GGGACTCATA ATA GTGGAAACAGC CCGTGATACC TGTCCGTAAT ATCTATTACA

```

961 TGCTTACCTA AATTCATCGT GACTGACTGA CGATCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG
 1021 GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG
 1081 CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG
 1141 CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATAATTC TTGAAGACGA AAGGGCCTCG
 1201 TGATACGCCT ATTTTATATAG GTTAATGTCA TGATAATAAT GGTTTCCTTAG TCGACCTGCA
 1261 GCCAAGCTTA ATTAGCTGAG CTGGACTCC TGTGATAGA TCCAGTAATG ACCTCAGAAC
 1321 TCCATCTGGA TTTGTTTCAGA ACGCTCGGTT GCCGCGGGGC GTTTTTTATT GGTGAGAATC
 1381 CAAGCTAGCT TGGCGAGATT TTCAGGAGCT AAGGAAGCTA AAATGGAGAA AAAAATCACT
 1441 GGATATACCA CCGTTGATAT ATCCCAATGG CATCGTAAAG AACATTTTGA GGCATTTTCAG
 1501 TCAGTTGCTC AATGTACCTA TAACCAGACC GTTCAGCTGG ATATTACGGC CTTTTTAAAG
 1561 ACCGTAAAGA AAAATAAGCA CAAGTTTTAT CCGGCCTTTA TTCACATTCT TGCCCGCCTG
 1621 ATGAATGCTC ATCCGGAATT TCGTATGGCA ATGAAAGACG GTGAGCTGGT GATATGGGAT
 1681 AGTGTTCACC CTTGTTACAC CGTTTTCCAT GAGCAAACCTG AAACGTTTTTTC ATCGCTCTGG
 1741 AGTGAATACC ACGACGATTT CCGGCAGTTT CTACACATAT ATTCGCAAGA TGTGGCGTGT
 1801 TACGGTGAAA ACCTGGCCTA TTTCCCTAAA GGGTTTTATTG AGAATATGTT TTTTCGTCTCA
 1861 GCCAATCCCT GGGTGAGTTT CACCAGTTTT GATTTAAACG TGGCCAATAT GGACAACCTC
 1921 TTCGCCCCCG TTTTCACCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 1981 CTGGCGATTC AGGTTTATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 2041 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
 2101 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 2161 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 2221 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 2281 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGCGGGG TGTGCGGGCG CAGCCATGAC
 2341 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 2401 GTECTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 2461 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG
 2521 CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 2581 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAAGG CAGCAAAAAG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 2641 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 2701 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 2761 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC GTTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGATACCTT GTCCGCCTTT
 2821 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
 2881 TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 2941 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 3001 GCAGCAGCCA CTGGTAAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 3061 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 3121 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAAGATT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
 3181 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 3241 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGAACGA AAACTCACGT
 3301 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 3361 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 3421 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC
 3481 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCCT
 3541 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 3601 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCC TGCACCTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTATT
 3661 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTGTGT
 3721 GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
 3781 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 3841 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATAT ACTCATGGTT
 3901 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 3961 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC
 4021 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 4081 GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCCG
 4141 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT
 4201 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 4261 TGTGAAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 4321 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGCG
 4381 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 4441 TATAAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCACC TCGAGAAATC ATAAAAAATT
 4501 TATTTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT
 4561 TCACACAGAA TTCATTTAAAG AGGAGAAATT AACTGC

2.5. pMC63

Nachstehend angegeben ist die Sequenz von pMC63 (1935 bp), basierend auf einer persönlichen Mitteilung von E. Raleigh (Fa. *New England Biolabs*, Beverly, USA). Fett hervorgehoben sind die beiden vorhandenen Erkennungssequenzen der *FnuDII*-Methyltransferase (5'-CGCG-3', bei Pos. 1841 und bei Pos. 1905), aus deren vollständiger Methylierung zu 5'-MGCG-3' (M = 5-Methylcytosin) pro *M.FnuDII*-Erkennungssequenz zwei Erkennungssequenzen für das *McrBC*-Restriktionssystem (5'-GM-3') im abgebildeten Strang (unterstrichen hervorgehoben) bzw. im Gegenstrang (durch doppelten Unterstrich markiert) entstehen.

```

1  GAGTCAGGCA ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT
61 TAAGCATTGG TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAAC
121 TCATTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAA
181 CCCTTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC
241 TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCACGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT
301 ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAAC
361 CTTCAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA
421 CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC
481 TGCTGCCAGT GGCATAAGT CGTGCTTAC CGGGTGGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA
541 TAAGGCGCAG CGGTCGGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC
601 GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCTATGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA
661 AGGGAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG
721 GGAGCTTCCA GGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG
781 ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG
841 CAATTCGGCC TTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTCTTTCC
901 TCGGTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGG
961 TAAGAGGTTT CAACTTTCAC CATAATGAAA TAAGATCACT ACCGGGCGTA TTTTTTGAGT
1021 TATCGAGATT TTCAGGAGCT AAGGAAGCTA AAATGGAGAA AAAATCACT GGATATACCA
1081 CCGTTGATAT ATCCCAATGG CATCGTAAAG AACATTTTGA GGCATTTTCA TCAGTTGCTC
1141 AATGTACCTA TAACCAGACC GTTCAGCTGG ATATTACGGC CTTTTTAAAG ACCGTAAAGA
1201 AAAATAAGCA CAAGTTTAT CCGGCCTTTA TTCACATTCT TGCCCGCCTG ATGAATGCTC
1261 ATCCGGAATT CCGTATGGCA ATGAAAGACG GTGAGCTGGT GATATGGGAT AGTGTTCAAC
1321 CTTGTTACAC CGTTTTCCAT GAGCAAAC TGAAACGTTTT ATCGCTCTGG AGTGAATACC
1381 ACGACGATTT CCGGCAGTTT CTACACATAT ATTCGCAAGA TGTGGCGTGT TACGGTGAAA
1441 ACCTGGCCTA TTTCCCTAAA GGGTTTATTG AGAATATGTT TTTGCTCTCA GCCAATCCCT
1501 GGGTGAGTTT CACCAGTTT GATTTAAACG TGGCCAATAT GGACAAC TTCGCCCCCG
1561 TTTTACCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG CTGGCGATTC
1621 AGGTTTATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT GAATTACAAC
1681 AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT TGGTGCCCTT
1741 AAACGCCTGG TGCTACGCC GAATAAGTGA TAATAAGCGG ATGAATGGCA GAAATTCGAA
1801 AGCAAATTCG ACCCCATCGA TAAGCTGTCA AACAGATCTG CGCGCAGAGC TTGCATGCCT
1861 GCAGGTCGAC TCTAGAGGAT CCCCGGGTAC CGAGCTCGAA TTTCGCGCT CGAGTCTACG
1921 CCGGACGCAT CGATG

```

2.6. pMcrSb1

Nachstehend angegeben ist die Sequenz des Substrat-Plasmides pMcrSb1 (5129 bp).

Das Plasmid birgt ein mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ClaI* aus pBW5 entnommenes Insert in einem durch Schnitte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *AsuII* gewonnenen Rahmen aus pBW201. Die durch *ClaI* (erkennt und schneidet 5'-AT↓CGAT-3') bzw. *AsuII* (erkennt und schneidet 5'-TT↓CGAA-3') entstandenen Enden von pBW5-Insert bzw. pBW201-Rahmen sind kompatibel und ergeben nach Ligation die durch einen Unterstrich hervorgehobene Sequenz 5'-ATCCAA-3' (bei Pos. 700). Kursiv hervorgehoben ist die zur Generierung von pMcrSb1 ebenfalls verwendete Erkennungssequenz von *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3', bei Pos. 1), die auch zur Generierung von pMcrSb2 und PMcrSb3 durch Insertion von Sb61-11.11 in pMcrSb1 verwendet wurde. Fett hervorgehoben (Pos. 3607 bis Pos. 4836) ist das *hsmFI*-Gen aus *Bacillus subtilis* (NCBI *GenBank* Registrierungsnummer X51515), das für die DNA-Methyltransferase *M.BsuFI* (SWISS-PROT Registrierungsnummer P17044) codiert. *M.BsuFI* methyliert die Sequenz 5'-CCGG-3' zu 5'-MCGG-3' (M = 5-Methylcytosin).

```

1 GAATTCAATA AGTTCTCTAT TATACAATTT TAAGTTTTTCC TCTAAAATTT TATCTGAGTT
61 AGGATGCTCT GCAATTAATT TTTTTTTGCT ACCGACTTTT TCAAAATGTA TAAGTGCTTG
121 CGATAGTGGG TCCGTTTCCG ATAAATTTTAA TCGAGAAATC AAATCCGAAA CACTACCTTC
181 ATGTATAGTG ACAGTTTTTTT CACGAGTGTT TTTTATACTG ATATTCCTAA TTAATTCCTTT
241 TGTATTTGTT TTGATTGTAA CTGATACATC TGTTTTTCGGT TTTCCCTAT TGGATAATAG
301 AGGAATATCA TTTGTAGCGG TAACTTCAAG TATCTTATCA AAGCCTTCCT TTAGATCAAT
361 TTTTTC AAGG ATCTCTTTGT ATATCTTGTA TGTTGATGAT TTGATGGTTT GTTGAGCGTT
421 TTGATAATCA TTCCATAATG CTTTATTTTTT CAAATCATT AAGCAGTTAA CAATACTGGT
481 TTCAGCATCA TTACCAAGCA CATTAGCAG TAAGCCCTGC GCTATGTTTT GAGATGCCTT
541 TTCTACAATT TTTTGTCGCA ATTCATTAAC GGTAAAAACA TCAGTTAAAA AGGAAGTATA
601 TGTGTTCCG TTTATTTTTTA CGGAGTAGTT TCTTTTCTTT TTCATTTTCAG CTGAAGATAT
661 AGAATCTGGA ACAACAACAT ATATAATTTTT TACTTTCTCA TCGAAGACGA AAGGGCCTCG
721 TGATACGCCT ATTTTTATAG GTTAATGTCA TGATAATAAT GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG
781 GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA ATACATTCAA
841 ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCCT GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA
901 AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCC CCCTTATTCC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC
961 TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA AGATGCTGAA GATCAGTTGG
1021 GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTTC
1081 GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GCGCGGTAT
1141 TATCCCGTGT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTGCGCG CATACTACTAT TCTCAGAATG
1201 ACTTGGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
1261 AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACTTA CTTCTGACAA
1321 CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGTT TTTTGCACAA CATGGGGGAT CATGTAACCTC
1381 GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC AAACGACGAG CGTGACACCA
1441 CGATGCCTGC AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACCTATT AACTGGCGAA CTACTTACTC
1501 TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACCTC
1561 TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG
1621 GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA

```

1681 TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG
1741 GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT TTACTCATAT ATACTTTTAGA
1801 TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC
1861 TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCTACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA
1921 AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA
1981 AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTTC
2041 CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT
2101 AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC
2161 TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGCGGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC
2221 GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA
2281 GCTTGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG
2341 CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG
2401 GAGAGCTTCC GAGGGAGCTT CCAGGGGAAA ACGCCCTGGTA TCTTTATAGT CTTGTCGGGT
2461 TTCGCCACCT CTGACTTGAG CTGCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGG CGGAGCCTAT
2521 GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCCGAGATG CGCCGCGTGC GGCTGCTGGA GATGGCGGAC
2581 GCGATGGATA TGTTCTGCCA AGGGTTGGTT TGCGCATTC AAGTTCCTCCG CAAGAATTGA
2641 TTGGCTCCAA TTCTTGAGT GGTGAATCCG TTAGCGAGGT GCCGCCGGCT TCCATTCAGG
2701 TCGAGGTGGC CCGGCTCCAT GCACCGCGAC GCAACGCGGG GAGGCAGACA AGGTATAGGG
2761 CGGCGCTTAC AATCCATGCC AACCCGTTCC ATGTGCTCGC CGAGGCGGCA TAAATCGCCG
2821 TGACGATCAG CCGTCCAGTG ATCGAAGTTA GGCTGGTAAG AGCCGCGAGC GATCCTTGAA
2881 GCTGTCCCTG ATGGTCGTCA TCTACCTGCC TGGACAGCAT GGCTGCAAC GCGGGCATCC
2941 CGATGCCGCC GGAAGCGAGA AGAATCATAA TGGGGAAGGC CATCCAGCCT CGCGTCGCGA
3001 ACGCCAGCAA GACGTAGCCC AGCGGTCGG CCGCCATGCC GGCGATAATG GCCTGCTTCT
3061 CGCCGAAAACG TTTGGTGGCG GGACCAGTGA CGAAGGCTTG AGCGAGGGCG TGCAAGATTC
3121 CGAATACCGC AAGCGACAGG CCGATCATCG TCGCGCTCCA GCGAAAGCGG TCCTCGCCGA
3181 AAATGACCCA GAGCGCTGCC GGCACCTGTC CTACGAGTTG CATGATAAAG AAGACAGTCA
3241 TAAGTGCGGC GACGATAGTC ATGCCCCGCG CCCACCGGAA GGAGCTGACT GGGTTGAAGG
3301 CTCTCAAGGG CATCGGTCGA CTGTATAATA GTGCTGTGGG GTTGTGTGTA CAGATTAGAT
3361 AACTTCGTGG GGGTGTGGAG ATAGGATGGA TGTGGCTTTC TTGAGAAGTT GTTTAAATTC
3421 TAATATCGAG GTGATGTTAT GTTAAATAGA ATGTTAAAAG CAAGTGCAAG GTTATTTTTTA
3481 CGAAAAATAA AAAGTAAGCA CTACGTATCA ATATTGAAAT ATACGGACGT TTTCTTTTTT
3541 TGGGGTTATA ATTCAAATTA ATAGTGCTAT AATTTCCGTA TAATATTAAG ATAAAAGGTG
3601 ATTGCAATGC GTGGTGGAAA TCGACTCGGT GCAGGAAGGA AGGTTATTCC TGAGTCAGAA
3661 AAAAAAGAAA GAAAAAGCGT GTATATTACA GATAAACTTT ACACTAGAAT TATGGATACT
3721 GACATCGAAA ATTGCAATAA TTTCACTCAA AAATGTATGG CATTGATTGA ATTAGCAATG
3781 GAAAATCTAA ATAAGAACAA TCAAGAGCAT AGTGTGAAAA GGAACAATAT ATTGATGGTG
3841 AGAGATACCA AATCTACATA CAACAAAACG AATAATAATT TTGAAAAACA AAACCGTGGA
3901 ATAAAATTGA CATTATTGA TTTATTGCTT GGTATTGGAG GAATTAGATT AGGATTTGAA
3961 GACAAATATA CGAAATGTGT ATTTAGTTCT GAATGGGATA AATATGCAGC TCAAACGTAT
4021 GAAGCTAATT ATGGTGAGAA GCCTCATGGT GATATTACAA AAATCAACGA AAATGATATT
4081 CCAGATCAAG ATGTTTTATT GGCTGGATTT CCTTGTGAGC CGTTTAGCAA TATAGGCAAG
4141 CGTGAAGGTT TTGCTCATGA AAGAAGGAAC ATTATTTTTG ATGTTCTTAG GATCCTAAAG
4201 AAAAAAGCAAC CTAAGATGTT TTTGTTGGAA AATGTAAAAG GGCTTTTAAC AAATGATAAT
4261 GGAATACAT TTCGAGTCAT TTTAGACAA CTTAAGAGTC TAGGATATTC CGTTTTTTAT
4321 GAAGTTATGG ATGCACAAAA TTTTGGGCTT CCACAAAGAC GTGAACGTAT TGTAATTGTG
4381 GGATTTTATC CTGATTTAGG CATTAAATGAT TTTTCATTTT CTAAAGGTAA TCCTGACAAT
4441 AAGGTTCCAA TTAATGCTAT TTTAGAGCAT AATCCTACAG GGTATTCAAT TTCCAAGCGT
4501 TTGCAAGAAA GTTACTTAT TAAAAAGGAT GATGGGAAGC CACAGATTGT TGATTTTAGA
4561 TGCACATATC AAGTTAACAC TTTAGTAGCT AGTTATCACA AAATACAGCG TCTTACAGGA
4621 ACATTTGTAA AAGACGGAGA AACAGGGCTT CGATTATTCA GCGAATTAGA ACTGAAACGT
4681 TTGATGGGTT TCCCTGTTGA TTTTAAAGTT CCTGTGTCAA GAACACAAAT GTATAGGCAG
4741 TTTGGAAATT CTGTTGCTGT TCCCATGATT AAAGCTGTTG CAGGAGCAAT GAAAGAGCGA
4801 CTTTTGTTGG CTGAAATGCA GGTATTGAAA AAATAAAAAC TATAGCTTTA TAACTAATAT
4861 AGAGACTAAT ATCAGCAAGT ATAGTTTGCT GATATTAGTC TTTTGCCTTA ATTGTTTGAA
4921 AAACCTTTAA TCTGTATTTT TTGACCACGC TTTTGTCTTG GATAAGTCCA TTTAAAAGGA
4981 GTTCCAAATT GTCCTTTTCC ACTATATTCT TCGATGTAAT GTTTAATATA ATCATCACGA
5041 TTCCAAACAG CAAATTTAT TGTAAATATA ATTAAATCTA CCATTTGTAT CTTGTCAATG
5101 ACTAAAGGGC TATGTAAACC AAAAAAGAA

3. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: **Detlef Hartmut Groll**
Anschrift: Wagnerstr. 66, 89077 Ulm an der Donau
Geburtstag: 13.07.1971
Geburtsort: Uslar, Kreis Northeim
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang:

1977 - 1981: Besuch der Christian-Spielmann-Grundschule Weilburg
1981 - 1990: Besuch des Gymnasium Philippinum Weilburg
Juni 1990: Abschluss mit Abitur

Hochschulstudium:

Oktober 1990 bis August 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Oktober 1992 Diplom-Vorprüfung
Oktober 1995 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Botanik (1. Hauptfach), Genetik (2. Hauptfach), Biochemie (1. Wahlfach) sowie Zellbiologie (2. Wahlfach)
November 1995 bis August 1996 Diplomarbeit zum Thema "Untersuchung des Katalysemechanismus der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in Abhängigkeit verschiedener bivalenter Metallionen als Kofaktoren" im Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie
05.08.1996 Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe

seit Oktober 1996 Promotionsstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen
04.11.1996 bis 30.06.2000 Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Doktorarbeit im Institut für Biochemie, FB 08, der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Pingoud zum Arbeitsthema "Untersuchung der DNA-Spaltung durch die komplexe GTPase McrBC aus *Escherichia coli* K-12 – *In-vitro*-Experimente mit den Untereinheiten McrB und McrC sowie Vorstellung eines neuen Modells zur Enzymologie von McrBC"
seit Juli 2000 Schriftliche Ausarbeitung des experimentellen Teils der Doktorarbeit sowie Interpretation der Daten in der vorliegenden Dissertation

4. Danksagung

Mein Dank gilt ...

- ◆ meinem Doktorvater, Herrn PROF. DR. ALFRED PINGOUD, für die Ermöglichung und die Betreuung dieser Arbeit, für deren Förderung durch seine stets interessierte Diskussionsbereitschaft, durch sein Vertrauen in meine selbstständige Planung und Durchführung dieser Arbeit, durch seine stets begeisternde und motivierende, teilweise aber auch geduldige und nachsichtige Art sowie durch sein großes persönliches Engagement, seinen Mitarbeitern ein breitgefächertes Wissen zu vermitteln.

- ◆ Herrn PROF. DR. KARL FORCHHAMMER für seine freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

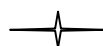
- ◆ meinen Kollegen der MCrBC-Arbeitsgruppe für die umfangreiche Unterstützung meiner Arbeit durch Austausch von Material und Wort, insbesondere bei der Planung, Auswertung und Diskussion der Experimente, aber auch bei weit darüber hinaus reichenden Themen. Mein Dank gilt hier besonders Herrn DR. UWE PIEPER, der mich während meiner gesamten Zeit der Doktorarbeit unterstützt hat und von dem ich in den letzten Jahren sehr viel lernen konnte. Mein besonderer Dank gilt hier ebenfalls Herrn DR. FRANK-ULRICH GAST, der zeitweilig ebenfalls Mitglied der MCrBC-Arbeitsgruppe war und dessen Fortgang vom Institut ein großer Verlust war und noch immer ist. Ein dickes Dankeschön hier ebenfalls an Frau DIPL.-BIOL. SANDRA WÜNSCH, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit bei uns tätig war.

- ◆ allen Kollegen des Instituts, die sich kritisch mit meiner Arbeit auseinandergesetzt und mir so die Möglichkeit für Verbesserungen gegeben haben. Hier gilt mein Dank ganz besonders Herrn DR. MEINHARD HAHN, der mir durch sein persönliches Engagement und seine harte, aber objektive Kritik nicht nur bei der Niederschrift dieser Arbeit eine große Hilfe war.

- ◆ allen nicht zu diesem Institut gehörenden Kollegen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Herrn DR. CHRISTIAN SPECK bedanken, der mir sehr bei meinen Arbeiten mit dem BIAcore-Instrument am Max Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlin) geholfen hat, sowie bei Herrn DR. NORBERT MÜCKE für seine Unterstützung bei meinen Arbeiten mit dem Rasterkraftmikroskop am Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg). Für die Überlassung von Materialien möchte ich mich bezüglich des Plasmids pMC63 sehr bei Frau DR. ELISABETH RALEIGH (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) und bezüglich des Plasmids pBW5 sehr bei Herrn DR. JÖRN WALTER (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) bedanken.

- ◆ ALLEN wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Kollegen des Instituts, die allesamt zu der sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre im Institut für Biochemie beigetragen haben. Die Arbeit bei Euch hat mir wirklich Spass gemacht, und ich wünsche Euch allen für Euren weiteren Werdegang von Herzen alles Gute.

- ◆ *Mein tiefster Dank gilt jedoch MEINEN ELTERN, die letztlich durch ihre familiäre Unterstützung auf der nichtwissenschaftlichen Seite meines Lebens noch mehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben als alle anderen hier erwähnten.*



Ergänzung zur Inauguraldissertation von Detlef Hartmut Groll mit dem

Titel "Untersuchung der DNA-Spaltung durch die komplexe GTPase McrBC aus *Escherichia coli* K-12 - *In-vitro*-Experimente mit den Untereinheiten McrB und McrC sowie Vorstellung eines neuen Modells zur Enzymologie von McrBC" (Gießen, 2001)

Übersicht der verwendeten DNA-Substrate (synthetische DNA, PCR-Produkte und Plasmidfragmente)

Die Anordnung der Moleküle erfolgt in dieser Darstellung nach:

1. Sequenzkontext 3' zur McrBC-Erkennungssequenz (5'-GCG-3', 5'-TGC-3' bzw. 5'-CGG-3')
2. Anzahl der McrBC-Erkennungselemente (2, 3, 4, 5, 9 bzw. 14)
3. Länge des DNA-Moleküls (61 bis 4113 bp)

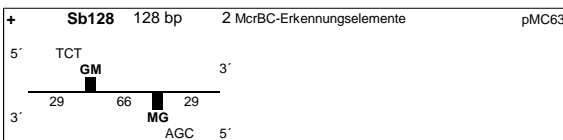
Legende (M = 5'-Methylcytosin)

-/+/+/+++	Name der DNA	Länge	Anzahl der McrBC-Erkennungselemente	Ursprung der DNA
	NNN (Sequenz 5' zu RM; Sequenzangabe 5' --> 3' im oberen Strang)			
	McrBC-Erkennungssequenz im oberen Strang der DNA (Leserichtung: 5' --> 3')			
	McrBC-Erkennungssequenz im unteren Strang der DNA (Leserichtung: 3' --> 5')			
	NNN (Sequenz 5' zu RM; Sequenzangabe 3' --> 5' im unteren Strang)			
	Zahlen: Anzahl der Basenpaare zwischen zwei McrBC-Erkennungselementen bzw. zwischen Ende des linearen DNA-Doppelstrangs (in Klammern: auf Einzelstrang bezogen) und McrBC-Erkennungselement			

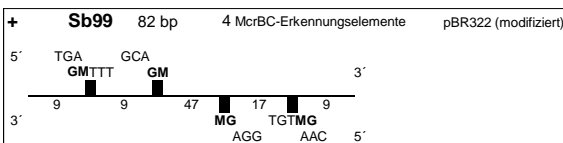
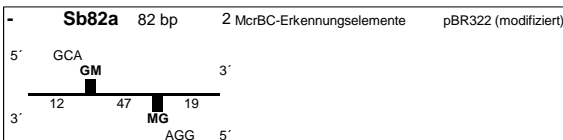
Spaltbarkeit der DNA durch das McrBC-System:

- = keine Spaltung der DNA durch McrBC
- + = Spaltprodukte in Spuren nachweisbar
- ++ = gute Spaltung der DNA durch McrBC
- +++ = sehr gute Spaltbarkeit der DNA durch McrBC

a) lineare DNA mit McrBC-Erkennungssequenzen im Sequenzkontext 5'-RMGCG-3'



b) lineare DNA mit McrBC-Erkennungssequenzen im Sequenzkontext 5'-RMTGC-3'



(In Sb99 weicht in 2 Fällen der Sequenzkontext 3' zur McrBC-Erkennungssequenz in der angegebenen Form ab)

c) lineare DNA mit McrBC-Erkennungssequenzen im Sequenzkontext 5'-RMCGG-3'

