

**Die Restriktionsendonuklease *EcoRII*:
Primitives antivirales Abwehrsystem der
Bakterien oder mehr?
Eine Struktur-Funktions-Analyse des Enzyms**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Molekulare Virologie

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. rer. nat. Monika Reuter

geboren am 08.10.1955 in Jarmen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Walter Messer

2. Prof. Dr. Alfred Pingoud

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 05.11.2002

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einführung in die Thematik	4
1.1. Restriktionsendonukleasen und DNA-Methyltransferasen – korrespondierende Enzyme, die in Bakterienzellen für die begrenzte Aufnahme fremder DNA sorgen.....	4
1.2. Die Diversität der TypII-Restriktionsendonukleasen	7
1.3. Die Restriktionsendonuklease <i>EcoRII</i>	9
2. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	11
2.1. <i>EcoRII</i> als Prototyp der TypIIE-Restriktionsendonukleasen (3-10).....	11
2.1.1. <i>EcoRII</i> braucht die Interaktion mit zwei Kopien seiner Erkennungssequenz zur enzymatischen Aktivität.....	11
2.1.2. Aktivierung von <i>EcoRII</i> durch synthetische Oligonukleotidduplexe.....	12
2.1.3. Aktivierung von <i>EcoRII</i> durch Spaltprodukte und nicht spaltbare Oligonukleotidduplexe	13
2.1.4. Weitere aktivierbare Restriktionsendonukleasen.....	15
2.1.5. Anwendungsmöglichkeiten des Prinzips der Enzymaktivierung in der Gentechnik und zum Nachweis epigenetischer Modifikationen	16
2.2. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von <i>EcoRII</i> (11, 12)	17
2.2.1. Kooperative Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsstellen	17
2.2.2. Stöchiometrie des aktiven Enzym-Substrat-Komplexes.....	18
2.3. Untersuchungen zur spezifischen DNA-Erkennung durch <i>EcoRII</i> (13-15).....	21
2.3.1. Lokalisierung von zwei DNA-bindenden Regionen in <i>EcoRII</i> mit synthetischen Peptiden.....	21
2.3.2. Identifizierung der für die Peptid-DNA Bindung kritischen Aminosäurereste durch Substitutionsanalyse.....	22
2.3.3. Austausch der kritischen Lysinreste verändert die DNA-Bindung oder die Katalyse des <i>EcoRII</i>-Proteins.....	22
2.3.4. Sequenzvergleiche identifizieren ähnliche Bindungsmotive in anderen Restriktionsendonukleasen.....	24
2.3.5. Eine monomere <i>EcoRII</i>-Untereinheit kann eine DNA-Erkennungssequenz binden... 	24

2.3.6. Transmissionselektronenmikroskopie zeigt durch <i>EcoRII</i> induzierte DNA-Schlaufen nach Interaktion mit zwei Erkennungsarten.....	26
2.3.7. “Photocross-linking”-Experimente identifizieren einen asymmetrischen direkten Kontakt des <i>EcoRII</i> -Proteindimers zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz.....	26
2.4. Untersuchungen zur Domänenorganisation von <i>EcoRII</i> (16)	28
2.4.1. Limitierte Proteolyse von <i>EcoRII</i> zeigt zwei stabil gefaltete funktionelle Domänen..	28
2.4.2. Expression der einzelnen <i>EcoRII</i> -Domänen erlaubt die Zuweisung distinkter Funktionen	29
2.5. Erste Versuche zur Kristallisierung von <i>EcoRII</i> und <i>EcoRII</i> -Mutanten (17)	30
2.6. Bedeutung der strukturellen Details für die Funktion der Restriktionsendonuklease <i>EcoRII</i>	30
2.6.1. Modell des molekularen Reaktionsmechanismus von <i>EcoRII</i>	30
2.6.2. <i>EcoRII</i> – eine Restriktionsendonuklease auf dem Weg zu neuen Funktionen?	32
3. Zusammenfassung	36
4. Literaturverzeichnis	39
4.1 Zitierte eigene Arbeiten (im Text mit Nummern angegeben)	39
4.2 Fremdzitate.....	41
Danksagung	49

1. Einführung in die Thematik

1.1. Restriktionsendonukleasen und DNA-Methyltransferasen - korrespondierende Enzyme, die in Bakterienzellen für die begrenzte Aufnahme fremder DNA sorgen

Restriktions- und Modifikationssysteme (R/M-Systeme) werden in vielen Bakterienspezies gefunden. Sie dienen den Bakterienzellen als Abwehrsysteme gegen fremde, in die Zelle gelangende DNA (Arber, 1979).

Die Entdeckung der R/M-Systeme geht auf die Beobachtung zurück, dass λ -Phagen, die auf einem *E. coli* C- oder B-Stamm vermehrt worden waren, auf einem anderen Stamm *E. coli* K-12 nur schlecht vermehrt werden konnten (Bertani und Weigle, 1953). Dieser Effekt wurde Restriktion genannt. Die Bakterienviren, die der Restriktion entgingen, produzierten Nachkommen, die sich auf *E. coli* K-12 vermehren konnten. Die überlebenden λ -Phagen waren keine Wirtsbereichsmutanten, weil sie nach einem weiteren Vermehrungszyklus auf *E. coli* C wieder sensitiv für die Restriktion auf *E. coli* K-12 wurden. Die Viren waren offensichtlich transient verändert, modifiziert worden. Erst viel später konnte bewiesen werden, dass die Vermehrung von λ -C in *E. coli* K-12 durch eine Restriktionsendonuklease, die fremde DNA zerstört, verhindert wird (Zusammenfassungen bei Meselson and Yuan, 1968; Linn and Arber, 1969). Die Bakterienviren, die der Restriktion entgehen, erhalten, wie das Bakterienchromosom, eine schützende Modifizierung durch ein spezifisches Modifikationsenzym, eine Methyltransferase, die definierte Basen innerhalb einer DNA-Erkennungssequenz methyliert (Arber and Dussoix, 1962; Smith et al., 1972). An dieser sequenz-spezifischen Methylierung, die nichts anderes als eine epigenetische Markierung darstellt, erkennt man die Herkunft einer DNA.

In der Regel bildet ein Restriktionsenzym gemeinsam mit einem Modifikationsenzym gleicher DNA-Spezifität ein R/M-System, das die DNA-Aufnahme aus anderen Zellen oder der Umgebung limitiert und auf diesem Wege die genetische Stabilität der Zelle gewährleistet (Arber, 1979). Wenn auch schwer zu prüfen, erscheint eine Rolle der R/M-Systeme als primitives Immun- oder Abwehrsystem der Bakterien realistisch, nicht zuletzt weil Viren und konjugative Plasmide vielfältige Mechanismen entwickelt haben, ihre genetische Information vor der zerstörerischen Wirkung der Restriktionsendonukleasen ihrer Wirtszellen zu schützen (Zusammenfassung bei Krüger and Bickle, 1983). Dennoch wird seit einigen Jahren über weitere Funktionen der R/M-

Systeme spekuliert, die erklären sollen, warum diese Enzyme während der Evolution so zahlreich und in ihrer Vielfalt erhalten geblieben sind. Eine Hypothese geht davon aus, dass R/M-Systeme die Zelle nicht vor genetischen Parasiten schützen, sondern dass sie, im Gegenteil, selbst „egoistische“ genetische Parasiten sind, die nur auf ihr Überleben innerhalb einer Population ausgerichtet sind. Dieser Schlussfolgerung liegt die Beobachtung zugrunde, dass Bakterienzellen, die ihre R/M-codierenden Gene verlieren, sterben (Naito et al., 1995). Das beruht auf der Tatsache, dass eine DNA-Methyltransferase jeden Ort in einer DNA methylieren muß, um sie zu schützen, während schon ein einziger DNA-Doppelstrang-Bruch durch eine Restriktionsendonuklease genügt, um ein Genom zu zerstören. Es wird argumentiert, dass das bakterielle Genom durch die verbleibenden, sich mit der Zell-Vermehrung verdünnenden, Methyltransferase-Moleküle nicht mehr vollständig methyliert werden kann und durch die restlichen in der Zelle vorhandenen Restriktionsendonuklease-Moleküle endonukleolytisch abgebaut wird (für eine Übersicht s. Kobayashi, 2001). Dass sich bakterielle Genome vor R/M-Genen in gewisser Weise schützen, könnte auch aus Arbeiten von Rocha et al. (2000) interpretiert werden. Die Autoren analysierten, in welchem Maße, kurze palindrome Sequenzen in Virusgenomen und in den Genomen ihrer Wirtszellen vorkommen. Der Vergleich zeigte, dass wider Erwarten die stärkere Kontraselektion gegen Palindrome in den meisten Fällen in den Genomen der Bakterien und nicht in denen der Viren stattgefunden hat. Das Ergebnis könnte für den invasiven Charakter der R/M-Systeme und den dadurch entstehenden evolutionären Druck auf die Bakteriengenome sprechen.

In den letzten Jahren haben Analysen der Nukleotidsequenzen bakterieller Genome gezeigt, dass R/M-Systeme unter Prokaryoten deutlich weiter verbreitet sind als erwartet, wenngleich sie nicht immer in ihren Wirtszellen exprimiert werden. Mehr als 80 % der vollständig sequenzierten bakteriellen Genome codieren mindestens ein R/M-System. Es ist bemerkenswert, dass in Bakterien, die außergewöhnliche Lebensräume besiedeln, z.B. solche, die parasitär in eukaryotischen Zellen oder aber unter extrem hohen Temperaturen leben, offene Leserahmen für R/M-Systeme eher selten gefunden wurden (Murray, 2001). In *Helicobacter pylori*-Stämmen wiederum, die als eine der wenigen Bakterienspezies den menschlichen Magen besiedeln können und mit der Entstehung von Magengeschwüren und -Karzinomen assoziiert sind, wurden 14 bzw. 15 potentielle R/M-Systeme (entspricht etwa 1 % des Genoms) identifiziert (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist es besonders überraschend, dass nur ein Virus, das

Helicobacter-Stämme infiziert, bekannt ist (Kong *et al.*, 2000). Andererseits entwickelt *Helicobacter* eine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von chromosomaler und Plasmid-DNA, so dass eine biologische Rolle dieser R/M-Systeme tatsächlich in der Barrierefunktion gegen DNA-Austausch zwischen verschiedenen Bakterienspezies liegen könnte (Ando *et al.*, 2000). In jedem der bisher analysierten Genome von *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen sind mehr als 20 verschiedene R/M-Gene identifiziert worden (Roberts, 1998). Es ist schwer vorstellbar, dass diese Bakterien so viele R/M-Systeme brauchen, ausschließlich um fremde DNA abzuwehren. Es ist denkbar, dass neue biologische Funktionen von R/M-Systemen, gerade in den beschriebenen humanpathogenen Bakterienspezies, gefunden werden, die mit der Pathogenität des Erregers in Verbindung stehen. Kürzlich wurde der Zusammenhang zwischen der Expression des R/M-Systems *NmeSI* und der Hypervirulenz eines *Neisseria meningitidis*-Stammes beschrieben (Bart *et al.*, 2001).

Der Vergleich von genomischen Sequenzen, GC-Gehalten und Codon-Nutzung ergab verschiedene Hinweise darauf, dass R/M-Gene häufig innerhalb eines Genoms und zwischen verschiedenen Genomen horizontal transferiert werden, und dass sie dabei DNA-Umbauten bewirken können (Stein *et al.*, 1998; Chinen *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Kobayashi, 2001; Lin *et al.* 2001). Für die Mobilität von R/M-Genen spricht auch die Flankierung durch direkte oder invertierte repetitive Sequenzen (Gunn and Stein, 1997; Kobayashi *et al.*, 1999), ihre Lokalisierung auf Transposon-ähnlichen Elementen (Rochepeau *et al.*, 1997) oder ihre Nähe zu Sequenzen, die Transposasen und Rekombinasen codieren (für eine Übersicht siehe Kobayashi, 2001).

Ähnlich wie der horizontale Gentransfer von R/M-Genen könnte ihre Wirkung als „Evolutionsgene“ (Arber, 2000) zur Variabilität der prokaryotischen Genomorganisation beitragen. Bei der Spaltung fremder DNA durch Restriktionsendonukleasen werden DNA-Fragmente produziert, die gleichzeitig einen Pool potentiell rekombinationsfähiger DNA darstellen und über illegitime Rekombination ins zelluläre Genom aufgenommen werden können.

Ob nun das Abwehrprinzip, das Wirken als „egoistische“ molekulare Parasiten oder das Genomvariationsprinzip oder aber ihre Kombination die Evolution der R/M-Gene vorantreiben, bleibt zu beweisen. Möglicherweise bringen weitere Sequenzdaten bakterieller Genome und Strukturaufklärungen verschiedenster pro- und eukaryotischer Enzyme neue Ansatzpunkte zur Klärung dieser Frage.

1.2. Die Diversität der TypII-Restriktionsendonukleasen

Drei verschiedene, gut charakterisierte Typen von Restriktionsendonukleasen (I, II und III) sind gefunden worden, die von R/M-Systemen codiert und entsprechend ihrer Zusammensetzung aus Proteinuntereinheiten, der Art ihrer DNA-Erkennungssequenz, ihrer Kofaktoren und ihres Wirkungsmechanismus klassifiziert wurden (1).

Die TypII-Restriktionsendonukleasen machen mit 3333 von insgesamt 3392 bekannten Restriktionsendonukleasen und 200 von insgesamt 228 verschiedenen DNA-Spezifitäten die größte Gruppe aus (Roberts and Macelis, 2001). Der gegenwärtige Stand des Wissens über Struktur und Funktion dieser Enzyme ist von Pingoud and Jeltsch (2001) umfassend und detailliert dargestellt worden. Die orthodoxen TypII-Restriktionsendonukleasen sind im Allgemeinen als Homodimere aktive Enzyme, die in Anwesenheit von Mg^{2+} beide Stränge der DNA in einer koordinierten Aktion innerhalb einer, meist palindromen DNA-Erkennungssequenz spezifisch spalten. Die dazugehörenden Modifikationsenzyme sind separate Proteinmoleküle und, entsprechend ihrer Funktion neu replizierte DNA zu methylieren, als Monomere aktiv. Zahlreiche Untersuchungen zur Struktur und Funktion von TypII-Restriktionsendonukleasen in den letzten zehn Jahren haben gezeigt, dass eine Reihe von Enzymen von der bis dahin engen Definition der TypII-Enzyme abweichen. Sie sind deshalb in verschiedenen Subtypen klassifiziert worden (Pingoud and Jeltsch, 2001). Im Subtyp IIE sind Enzyme zusammengefaßt, die mit zwei Kopien ihrer Erkennungssequenz wechselwirken müssen, wobei die eine Erkennungssequenz als Substrat, die andere als Effektor wirkt (z. B. *EcoRII*, *NaeI*). Die Enzyme des Subtyps IIF sind dem Subtyp IIE ähnlich, da sie auch mit zwei Erkennungssequenzen interagieren. Sie spalten allerdings beide Erkennungsorte in einer konzertierten Aktion (*SfiI*, *NgoMIV*). Der Subtyp IIS umfaßt Restriktionsendonukleasen, die asymmetrische Erkennungssequenzen erkennen und in definiertem Abstand außerhalb der Erkennungssequenz spalten (z. B. *FokI*, *HphI*). Andere Restriktionsendonukleasen spalten die DNA an beiden Seiten ihrer Erkennungssequenz (Subtyp IIB), erkennen nur methylierte Erkennungssequenzen (Subtyp IIM), sind aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt (Subtyp IIT) oder vereinen Restriktions- und Modifikationsaktivität in einem einzigen Polypeptid (Subtyp IIG). Die einzelnen Enzyme können dabei durchaus Merkmale verschiedener Subtypen tragen, so dass eine Zuordnung zu verschiedenen Subtypen denkbar wäre. Obwohl diese künstliche Klassifizierung der TypII-

Restriktionsendonukleasen sicher nur von begrenzter praktischer Bedeutung ist, demonstriert sie doch eindrucksvoll, dass die Gruppe der TypII-Restriktionsendonukleasen weitaus heterogener ist als bisher vermutet.

Die Entdeckung der Restriktionsendonukleasen und ihrer Fähigkeit zur sequenz-spezifischen DNA-Spaltung war eine methodische Voraussetzung für die Entwicklung der Molekularbiologie. Heute sind diese Enzyme, insbesondere die TypII-Restriktionsendonukleasen, unentbehrliche Werkzeuge für Genanalysen und Klonierungsexperimente. Trotz der gegenwärtig verfügbaren Vielfalt an TypII-Restriktionsendonukleasen geht die Suche nach immer neuen DNA-Spezifitäten weiter. Ein erklärtes und von vielen Forschern verfolgtes Ziel ist es, Regeln der molekularen DNA-Erkennung dieser Enzyme aufzudecken, um mit dieser Kenntnis deren DNA-Spezifität gezielt zu verändern. Wegen der Komplexität dieser Erkennungsprozesse sind Fortschritte bei der Veränderung der DNA-Spezifität von Restriktionsendonukleasen sehr selten (Lanio *et al.*, 2000; Lukacs *et al.*, 2000).

TypII-Restriktionsendonukleasen bilden eine der größten Gruppen funktionell ähnlicher Enzyme mit verschiedenen DNA-Bindungsspezifitäten – Eigenschaften, die sie zu idealen Modellen für das Studium molekularer Erkennungsprozesse machen. Mit Ausnahme einiger eng verwandter Isoschizomere zeigen TypII-Restriktionsendonukleasen keine Sequenzhomologie, was dazu führte, dass sie für evolutionär nicht verwandt gehalten wurden. Alle bisher analysierten Kristallstrukturen offenbarten aber ein sehr ähnliches katalytisches „Core“, das aus einem 5-strängigen β -Faltblatt, flankiert von α -Helices, besteht. Das „Core“ enthält das katalytische Zentrum und bringt zwei Carboxylatreste, meistens einen Aspartat- und einen Glutamat- oder Aspartatrest, in räumliche Nähe zueinander (Pingoud and Jeltsch, 2001). Diese Struktur ist interessanterweise auch in anderen Proteinen mit Endonukleasefunktion nachgewiesen worden: der λ -Exonuklease (Kovall and Matthews, 1998), dem MutH-Protein (Ban and Yang, 1998), der Vsr (very short patch)-Reparaturenuklease (Tsutakawa *et al.*, 1999) und einer Transposase-Untereinheit des Transposons Tn7 (Hickman *et al.*, 2000). Sequenzvergleiche und Strukturvorhersagen haben darüber hinaus eine evolutionäre Verwandtschaft von TypII-Restriktionsendonukleasen mit ortsspezifischen Rekombinasen (Topal and Conrad, 1993; Nunes-Düby *et al.*, 1998), der Hjc-Resolvase, einem Rekombinationsenzym aus Archaeobakterien (Daiyasu *et al.*, 2000), der Endonuklease VII, einem Reparaturenzym des Bakterienvirus T4 (Aravind *et al.*, 2000) und den

Homing-Endonukleasen (Bujnicki *et al.*, 2001) herausgearbeitet. Diese Ähnlichkeiten sprechen dafür, dass sich die Evolution der TypII-Restriktionsendonukleasen sehr wahrscheinlich divergent von einem oder wenigen gemeinsamen Vorläuferprotein(en) vollzogen hat.

1.3. Die Restriktionsendonuklease *EcoRII*

Das *EcoRII*-R/M-System wurde bei der Untersuchung klinischer *Escherichia coli*-Isolate auf ihre Fähigkeit zur Restriktion von λ -Phagen gefunden (Bannister and Glover, 1968; Yoshimori *et al.*, 1972). Die *EcoRII*-Restriktionsendonuklease erkennt die DNA-Sequenz 5'CC(A/T)GG und spaltet die Phosphodiesterbindung vor dem ersten Cytidin der unmethylierten Sequenz. Dabei entstehen kohäsive DNA-Spaltenden mit Überhängen von 5 Nukleotiden. Ihr GC-Gehalt von 80% ist wahrscheinlich für die besondere Neigung zur Reassoziaton verantwortlich (Boyer *et al.*, 1973). Die korrespondierende Methyltransferase schützt den Erkennungsort vor endonukleolytischem Abbau, indem sie die C-5 Position des zweiten Cytidins methyliert (Boyer *et al.*, 1973; Buryanov *et al.*, 1978). Die Gene für das *EcoRII*-R/M-System wurden kloniert (Kosykh *et al.*, 1980) und die Nukleotidsequenzen bestimmt. Die Gene des *EcoRII*-R/M-Systems werden von verschiedenen Strängen in konvergenter Richtung transkribiert. Der offene Leserahmen der Restriktionsendonuklease codiert für ein 45,6 kDa großes Protein (Som *et al.*, 1987; Kosykh *et al.*, 1989; Bhagwat *et al.*, 1990).

Aus Untersuchungen zum Einfluß von modifizierten Nukleotiden innerhalb und in der Nähe der Erkennungssequenz sowie von veränderten Internukleotidbindungen auf die Wechselwirkung der *EcoRII*-Restriktionsendonuklease mit ihrem Substrat geht hervor, dass das zentrale A/T-Paar in der Erkennungssequenz eine Rolle bei der Interaktion mit *EcoRII* spielt. *EcoRII* wechselwirkt gleichzeitig mit beiden Strängen des Substrates, spaltet sie aber unabhängig voneinander in einem Bindungsereignis (Yolov *et al.*, 1985; Petrauskene *et al.*, 1998). *EcoRII* reagiert im Vergleich zu *MvaI*, einem isoschizomeren Enzym, wesentlich empfindlicher auf Strukturveränderungen in der DNA-Erkennungssequenz (Cech *et al.*, 1988).

Untersuchungen zur Wirkung von *EcoRII* *in vivo* sind nur in geringem Umfang durchgeführt worden. Die nahe verwandten Bakteriophagen f1, fd und M13 werden *in vivo* in *EcoRII*-exprimierenden Wirtsstämmen nicht restringiert, die isolierten replikativen Formen der Phagengenome werden, trotz vorhandener Erkennungsorte, nur partiell gespalten (Vovis *et al.*,

1975). Hattman et al. (1979) konnten Φ X174 DNA, trotz fehlender Methylierung, nur dann mit *EcoRII* spalten, wenn unspezifische heterologe DNA zugesetzt wurde. Das Phänomen wurde von den Autoren nicht näher untersucht.

Bei der Untersuchung verschiedener R/M-Systeme auf die Vermehrungsfähigkeit der virulenten Bakterienviren T3 und T7 machten wir ähnliche Beobachtungen. Beide Viren wurden in *EcoRII*-codierenden Wirtszellen nicht restringiert, obwohl in beiden Virusgenomen Erkennungsstellen für *EcoRII* vorhanden sind. Auch *in vitro* ist keine Spaltung der DNA durch *EcoRII* zu erreichen. Die isoschizomeren Enzyme *BstNI* und *MvaI* spalten dagegen T3- und T7-DNA. Die Ursache der Resistenz gegenüber *EcoRII* ist nicht in einer Methylierung der DNA zu suchen, da wir nachweisen konnten, dass das T3-Genom vollständig unmethyliert ist (2). Auffällig war lediglich eine starke Kontraselektion gegen *EcoRII*-Erkennungsorte im Genom beider Viren (Schroeder et al., 1986).

Wir haben daraufhin versucht, systematisch nach Ursachen für die Resistenz der *EcoRII*-Erkennungsorte in den Virusgenomen zu suchen und sind dabei auf den bemerkenswerten Reaktionsmechanismus der Restriktionsendonuklease *EcoRII* gestoßen.

2. Zusammenfassung der Ergebnisse

2.1. *Eco*RII als Prototyp der TypII-E-Restriktionsendonukleasen (3-10)

2.1.1. *Eco*RII braucht die Interaktion mit zwei Kopien seiner Erkennungssequenz zur enzymatischen Aktivität

Die Resistenz der sehr selten vorkommenden *Eco*RII-spezifischen Erkennungsorte in den Genomen der eng verwandten Viren T3 und T7 gegen *Eco*RII-Spaltung warf zunächst die Frage nach dem möglichen Einfluß von Nachbarschaftsbasen auf. Nach Klonierung eines *Eco*RII-Erkennungsortes einschließlich der 5'- und 3'-benachbarten Sequenzen aus dem T7-Genom in einen an sich durch *Eco*RII spaltbaren Vektor, wurde auch der aus T7 stammende *Eco*RII-Erkennungsort für *Eco*RII suszeptibel. Damit war bewiesen, dass die auf beiden Seiten unmittelbar benachbarten Basenpaare (bp) nicht die Ursache für die Resistenz des *Eco*RII-Erkennungsortes gegenüber der *Eco*RII-Spaltung sind (3).

Wir haben dann demonstriert, dass die resistenten *Eco*RII-Erkennungsorte der Bakteriophagen-Genome von T3 und T7 auch gespalten werden können, wenn sie mit einer heterologen spaltbaren DNA (z.B. pBR322 Plasmid-DNA oder DNA des Bakterienvirus λ) koinkubiert werden. Um zu erfahren, ob diese "Aktivator-Moleküle" wie ein Katalysator in geringsten Mengen wirken oder aber in einem definierten stöchiometrischen Verhältnis in der Reaktion vorhanden sein müssen, wurde die Konzentration der pBR322-DNA gegen eine konstante Konzentration von T3-DNA titriert. Die virale DNA wurde nur solange komplett von *Eco*RII gespalten, wie ein quantitatives Verhältnis von Erkennungsorten auf pBR322 : T3 von mindestens 2 : 1 erreicht wurde. Mit geringer werdenden pBR322-Konzentrationen nahm die Spaltung der T3-DNA deutlich ab. Diese direkte Korrelation zwischen der Konzentration der Aktivator-DNA und dem Grad der Aktivierung der *Eco*RII-Spaltung spricht für ein stöchiometrisches Verhältnis der an der *Eco*RII-Aktivierung beteiligten Reaktionspartner.

Interessant war auch unsere Beobachtung, dass die Spaltung von einzelnen pBR322-Fragmenten mit drei, zwei oder einem *Eco*RII-spezifischen Erkennungsort(en) mit der Zahl der *Eco*RII-Erkennungsorte drastisch abnimmt. Das DNA-Fragment mit einem Ort war gegenüber *Eco*RII resistent (4, 6).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die katalytische Aktivität der Restriktionsendonuklease *EcoRII* offensichtlich von der gleichzeitigen Wechselwirkung des Proteins mit zwei Kopien seiner DNA-Erkennungssequenz abhängt. DNA-Moleküle mit einem einzelnen oder sehr selten vorkommenden *EcoRII*-Erkennungsort(en) lassen sich nicht mit *EcoRII* spalten. Die Resistenz solcher DNA-Moleküle kann durch Ko-Inkubation mit DNA, die eine höhere Frequenz an *EcoRII*-Erkennungsorten hat, überwunden werden.

EcoRII war die erste Restriktionsendonuklease, für die diese besondere Anforderung an ihr DNA-Substrat, die sonst eher von Enzymen der DNA-Transposition, -Rekombination und -Replikation bekannt ist, beschrieben wurde. Wir postulierten daher, dass *EcoRII* der Prototyp einer Gruppe von Restriktionsendonukleasen sein könnte, die die Interaktion mit zwei Erkennungsorten in der DNA gemein hat.

2.1.2. Aktivierung von *EcoRII* durch synthetische Oligonukleotidduplexe

Wir vermuteten die Ursache dafür, dass bestimmte DNA-Moleküle trotz vorhandener unmethylierter Erkennungsorte durch *EcoRII* nicht spaltbar sind, in einem besonderen katalytischen Mechanismus der Restriktionsendonuklease *EcoRII*, dessen wichtigstes Merkmal die Wechselwirkung des Proteins mit zwei Erkennungsorten ist. Um die strukturellen und funktionellen Anforderungen an ein Aktivator-Molekül systematisch untersuchen zu können, war es wünschenswert außer der natürlichen, hochmolekularen Plasmid- und Virus-DNA (pBR322, λ) einfachere, weniger komplexe DNA-Strukturen für die *EcoRII*-Aktivierung zu finden.

Wir konnten mit synthetischen Oligonukleotidduplexen von nur 14-bp Länge, die einen singulären *EcoRII*-Erkennungsort enthielten, die Spaltung von T3-DNA durch *EcoRII* ebenso stimulieren wie durch die beschriebenen hochmolekularen DNAs (5). Das kurze Aktivator-Molekül wird dabei selbst durch *EcoRII* gespalten. Ein einzelner Strang des 14-bp Oligonukleotidduplexes oder ein Oligonukleotidduplex ohne *EcoRII*-spezifischen Erkennungsort hat keinen Effekt auf die Spaltung der T3-DNA durch *EcoRII*.

Die Aktivierbarkeit von *EcoRII* durch das kurze synthetische DNA-Molekül ist abhängig von dessen Konzentration. Für eine komplette Spaltung der T3-DNA haben wir ein optimales molares Verhältnis der Erkennungsorte von Oligonukleotiden zu T3 von etwa 140:1 gefunden. Der notwendige hohe Überschuss an Erkennungsorten auf dem synthetischen Oligonukleotidduplex im Vergleich zu denen auf der hochmolekularen Plasmid-DNA (2:1) ist

vermutlich auf die Unterschiede in der Stabilität der entsprechenden Enzym-Substrat-Komplexe zurückzuführen, die mit der Länge der DNA korreliert. Diese Daten unterstreichen das notwendige stöchiometrische Verhältnis der Reaktionspartner bei der Aktivierung von *EcoRII*.

Die Spaltung des als Aktivator eingesetzten 14-bp Oligonukleotidduplexes mit einem *EcoRII*-Erkennungsort ist nur dann möglich, wenn *EcoRII*, das aus zwei monomeren Untereinheiten besteht, in der Lage ist, zwei dieser Moleküle gleichzeitig *in trans* in einen Enzym-Substrat-Komplex zu binden, ähnlich als wären es zwei eng benachbarte Erkennungsorte auf einem DNA-Molekül (*in cis*).

Wir haben hier erstmals gezeigt, dass eine Restriktionsendonuklease gleichzeitig mit zwei verschiedenen DNA-Molekülen *in trans* interagieren kann.

2.1.3. Aktivierung von *EcoRII* durch Spaltprodukte und nicht spaltbare Oligonukleotidduplexe

EcoRII wird durch Zugabe von Aktivator-Molekülen in die Lage versetzt, *a priori* resistente DNA-Substrate zu spalten. Eine wichtige Frage zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus von *EcoRII* war, ob die Spaltbarkeit des Aktivators selbst eine essentielle Voraussetzung für die Aktivierung von *EcoRII* ist.

Dazu haben wir in pBR322 Plasmid-DNA, die sechs *EcoRII*-Erkennungsorte enthält und nachweislich als Aktivator von *EcoRII* fungieren kann, die Erkennungsorte durch *EcoRII*-Verdau komplett zerstört. Das Enzym wurde durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation entfernt und die pBR322/*EcoRII*-Spaltprodukte anschließend mit T3-DNA und *EcoRII* inkubiert. Wir konnten zeigen, dass *EcoRII* durch die Produkte der vorangegangenen Spaltreaktion aktiviert werden und die Spaltung der T3-DNA durchführen kann (6). Die *EcoRII*-Aktivierung gelingt nicht, wenn die *EcoRII*-Spaltorte in der pBR322-DNA durch Verdau mit einem *EcoRII*-Isoschizomer, z. B. *BstNI* oder *MvaI*, zerstört werden. Das Ergebnis beweist, dass die authentischen *EcoRII*-Spaltenden mit fünf 5'-überhängenden Basen zur *EcoRII*-Aktivierung führen. Sowohl *BstNI* als auch *MvaI* erkennen zwar dieselbe DNA-Sequenz wie *EcoRII*, produzieren aber Spaltenden mit nur einer 5'-überhängenden Base.

Außer *EcoRII*-gespaltener pBR322-DNA sind auch synthetische Oligonukleotide, die *EcoRII*-Spaltprodukte simulieren, effektive Aktivator-Moleküle. Essentiell scheint allerdings die 5'-Phosphatgruppe zu sein, da ohne diese keine Aktivierung von *EcoRII* erfolgt.

Oligonukleotidduplexe mit Modifikationen innerhalb der *EcoRII*-Erkennungssequenz, die selbst nicht mehr spaltbar sind, wurden ebenfalls mit Erfolg eingesetzt.

Untersuchungen an synthetischen Oligonukleotiden unterschiedlicher Länge belegen einen indirekten Zusammenhang zwischen der Länge eines Aktivator-Moleküls und seiner Spaltbarkeit durch *EcoRII*. Oligonukleotidduplexe von 14, 30 bzw. 71 bp Länge wurden durch *EcoRII* mit abnehmender Effizienz, unter den gegebenen Bedingungen zu 55, 37 bzw. 28 % gespalten. Die isoschizomere Restriktionsendonuklease *MvaI* spaltet diese Substrate unabhängig von deren Länge.

Die Spaltung natürlicher DNA-Fragmente mit einer unterschiedlichen Anzahl von *EcoRII*-Erkennungsorten, generiert durch Spaltung von pBR322-DNA mit verschiedenen anderen Restriktionsendonukleasen, zeigte darüber hinaus, dass Fragmente mit nur einem *EcoRII*-Erkennungsort von *EcoRII* nicht gespalten werden. Sind mehrere *EcoRII*-Erkennungsorte auf einem Molekül vorhanden, hat der Abstand zwischen ihnen einen entscheidenden Einfluß auf die Spaltbarkeit. Der Abstand zwischen zwei Orten darf eine kritische Distanz von ca. 1000 bp nicht überschreiten (6).

Diese Daten belegen eindeutig, dass die Aktivierung der Restriktionsendonuklease *EcoRII* nicht während der Spaltung der Aktivator-DNA vonstatten geht, da sowohl Reaktionsprodukte als auch Oligonukleotidduplexe, die selbst keine Substrate für *EcoRII* sind, zur Enzymaktivierung führen. Die Aktivator-DNA selbst muß nicht gespalten werden. Andere Voraussetzungen müssen aber dennoch für eine *EcoRII*-Aktivierung gegeben sein: (i) *EcoRII* muß das Aktivator-Molekül erkennen und binden können, (ii) für eine effiziente intermolekulare Reaktion (Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten *in trans*) muß das Aktivator-Molekül klein genug sein, um keine sterische Behinderung im Enzym-Substrat-Komplex darzustellen und (iii) für eine intramolekulare Interaktion von *EcoRII* (Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten *in cis*) darf der Abstand zwischen beiden nicht zu groß sein.

Die Ergebnisse lassen sich in einem Modell wie folgt zusammenfassen: *EcoRII* wechselwirkt im aktiven Enzym-Substrat-Komplex mit zwei Kopien seiner Erkennungssequenz, wobei einer der beiden Erkennungsorte als allosterischer Effektor wirkt und nicht gespalten werden muß. Der allosterisch wirkende Erkennungsort kann sowohl auf demselben als auch auf einem anderen DNA-Molekül als der zu spaltende Erkennungsort lokalisiert sein.

Die Interaktion von *EcoRII* mit Erkennungsorten auf unterschiedlichen DNA-Molekülen ist durch deren Länge und Konzentration, die Interaktion innerhalb eines DNA-Moleküls durch den Abstand zwischen den Erkennungsorten limitiert.

Der unkonventionelle Reaktionsmechanismus, nämlich dass *EcoRII* durch seine eigenen Spaltprodukte zum Schneiden seiner DNA-Erkennungssequenz aktiviert werden kann, ist inzwischen für eine weitere Restriktionsendonuklease, *SgrAI*, gezeigt worden (Bitinaite and Schildkraut, 2002).

2.1.4. Weitere aktivierbare Restriktionsendonukleasen

Es ist eine Erfahrung aus dem Laboralltag, dass einige Restriktionsendonukleasen ihre Substrate nur unvollständig spalten, ohne dass jedoch nach Ursachen dafür geforscht wurde. Deshalb war es interessant zu untersuchen, ob einige dieser Enzyme vielleicht ähnliche Anforderungen an die DNA stellen wie *EcoRII* und ob sie auch durch geeignete Oligonukleotidduplexe zur kompletten DNA-Spaltung aktiviert werden können.

Bei dieser Suche wurde eine Reihe von TypII-Restriktionsendonukleasen, isoliert aus den verschiedensten Mikroorganismen, gefunden, die mittels spezifischer Oligonukleotidduplexe stimuliert werden konnten, sämtliche Kopien ihrer DNA-Erkennungssequenz in der DNA zu spalten: *AtuBI*, *BspMI*, *Cfr9I*, *HpaII*, *NaeI*, *NarI*, *SacII*, *SauBMKI*, *Eco57I*, *Ksp632I* (Oller et al., 1991; 7). Es ist wahrscheinlich, dass die DNA-Spaltung durch diese Enzyme ebenfalls von der Anzahl der Erkennungsorte und eventuell auch von deren Abstand beeinflusst wird.

Hinzu kamen jetzt Berichte über weitere TypII-Restriktionsendonukleasen, die nachweislich zwei Erkennungsorte zur Aktivität benötigen – *Sau3AI* (Friedhoff et al., 2001), *FokI* (Vanamee et al., 2001) sowie *Acc36I*, *BsgI* und *BpmI* (Bath et al., 2002). Während einige dieser beschriebenen TypII-Restriktionsendonukleasen als Dimere in Lösung aktiv sind, dimerisieren andere erst in Gegenwart spezifischer DNA. Es sind auch einige Restriktionsendonukleasen bekannt, die als Tetramere identischer Untereinheiten mit zwei Kopien ihrer Erkennungssequenz wechselwirken - *SfiI* (Wentzell et al., 1995), *Cfr10I* (Siksnyš et al., 1999), *NgoMIV* (Deibert et al., 2000) und *BspMI* (Gormley et al., 2002).

Diese Enzyme haben trotz unterschiedlicher oligomerer Strukturen und Reaktionsmechanismen die spezielle Anforderung der Bindung zweier DNA-Erkennungsorte gemeinsam.

2.1.5. Anwendungsmöglichkeiten des Prinzips der Enzymaktivierung in der Gentechnik und zum Nachweis epigenetischer Modifikationen

Die Kenntnis, dass sich Restriktionsendonukleasen, die DNA *per se* nur inkomplett spalten, durch Zugabe sequenz-spezifischer synthetischer Oligonukleotidduplexe zur kompletten Spaltung befähigen lassen, hat sich als äußerst nützlich für gentechnische Experimente herausgestellt.

Die Kartierung von Genomen oder die Analyse von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen setzt eine komplette DNA-Spaltung voraus. Werden für diese Verfahren Restriktionsendonukleasen verwendet, die bestimmte DNA-Sequenzen – obwohl nicht methyliert – nur unvollständig oder gar nicht spalten, könnten die Ergebnisse fehlinterpretiert werden. Unter den bisher bekannten aktivierbaren Restriktionsendonukleasen sind einige, die C+G-reiche DNA-Sequenzen erkennen und deshalb bei der Kartierung von Säuger-Genomen Anwendung finden. Gerade von diesen Enzymen ist bekannt, dass sie ihre Erkennungsorte innerhalb einer DNA mit sehr unterschiedlicher Effizienz spalten. Ausgehend davon, dass die Aktivität der meisten dieser Enzyme durch CpG-Methylierung innerhalb ihrer Erkennungssequenz blockiert wird, könnten nicht gespaltene Erkennungsorte zwingend mit einer DNA-Methylierung in Verbindung gebracht werden, obwohl es sich um selten im Genom auftretende DNA-Erkennungsorte handelt, die wegen ihres Abstandes zueinander gegenüber der Restriktionsendonuklease refraktär sind.

DNA-Methylierung in Pro- und Eukaryoten wird oft wegen der einfachen Praktikierbarkeit durch parallele Spaltung einer DNA mit einem Paar isoschizomerer Restriktionsendonukleasen detektiert – dabei ist die eine Restriktionsendonuklease sensitiv gegenüber der zu bestimmenden Methylierung, die andere nicht. Während die methylierungsunabhängige Restriktionsendonuklease an allen spezifischen Erkennungsorten in einer DNA spaltet, kann die methylierungssensitive Restriktionsendonuklease nur an den unmethylierten Erkennungsorten spalten. Diese Methode wird unzuverlässig, wenn DNA-Moleküle unmethylierte, aber resistente Erkennungsorte enthalten.

Wir konnten zeigen, dass derartige Fehlerquellen sowohl beim Nachweis der *Dcm*-Methylierung in Bakterien (5'C^{5me}CA/TGG) mit dem Enzympaar *EcoRII* und *BstNI* als auch beim Nachweis von ^{5me}CpG in eukaryoter DNA mit dem Enzympaar *HpaII* und *MspI* auftreten können

(8,9). Die in den Tests verwendeten methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen *EcoRII* und *HpaII* gehören zu den Enzymen, die DNA in Abhängigkeit von der Frequenz an Erkennungsorten nur inkomplett spalten und die damit zu einer Fehlerquelle bei der Bestimmung von Methylierungsmustern werden. Wir haben dieses methodologische Problem durch die Zugabe von sequenz-spezifischen Oligonukleotidduplexen zum *EcoRII*- und *HpaII*-Spaltansatz gelöst. Die Oligonukleotidduplexe aktivieren die Enzyme, so dass alle unmethylierten Erkennungsorte gespalten werden. Die Resistenz der methylierten Erkennungsorte wird durch die Zugabe der Aktivator-Moleküle nicht beeinflusst (8, 9).

Darüber hinaus haben wir gefunden, dass die Enzym-Aktivierung durch Oligonukleotidduplexe sogar mit hochmolekularer genomischer DNA, die zum Schutz vor Scherkräften in Agarose eingebettet wird, funktioniert. Der molare Überschuss an Erkennungsorten auf den Aktivator-Molekülen über die Erkennungsorte in der Substrat-DNA muß hier allerdings 5-10mal höher sein als bei einer Reaktion in Lösung (10).

2.2. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von *EcoRII* (11, 12)

2.2.1. Kooperative Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsorten

Wenn das vorhergesagte Zwei-Erkennungsorte-Modell tatsächlich der *EcoRII*-Enzymaktivität zu Grunde liegt, dann müsste sich eine Substratkooperativität nachweisen lassen.

Da die Spalteffizienz bestimmter *EcoRII*-Erkennungsorte nicht durch Nachbarschaftsbasen beeinflusst wird, sondern sehr wahrscheinlich durch die vorliegende Dichte von Erkennungsorten in der DNA, ist eine strikte qualitative Unterscheidung zwischen Aktivator-Molekül und "schlechtem" Substrat durch *EcoRII* nicht zu erwarten. Gabbara und Bhagwat (1992) bestätigten diese Vermutung, indem sie zeigten, dass kurze Aktivator-Moleküle (14 bp) in geringen Konzentrationen selbst auch ineffizient gespalten werden. Bei hohen Konzentrationen dagegen wirken die Oligonukleotidduplexe als Aktivator und sind gleichermaßen gute Substrate für *EcoRII* – ein Prozess, der positive Substratkooperativität zeigt. Die Wechselwirkung der gereinigten *EcoRII*-Restriktionsendonuklease wurde deshalb nicht an hochmolekularer DNA, sondern am Modell synthetischer Oligonukleotidduplexe mit einem bzw. zwei *EcoRII*-Erkennungsorten im Abstand von 55 bp untersucht. Die folgenden drei

Oligonukleotidduplexe wurden als Substrate für *EcoRII* eingesetzt und ihre Spaltung in Abhängigkeit von der Konzentration der Erkennungsorte quantitativ bestimmt – ein 30-mer mit einem Erkennungsort, ein 111-mer mit einem bzw. zwei Erkennungsorten. Das entscheidende Merkmal bei der Spaltung beider Oligonukleotidduplexe mit einem *EcoRII*-Erkennungsort (30- und 111-mer) ist eine sigmoidale Abhängigkeit der Spalteffizienz von der Konzentration der *EcoRII*-Erkennungsorte. Die DNA-Spaltung wird abrupt geringer oder findet nicht mehr statt, wenn eine minimale DNA-Konzentration unterschritten wird (11). Die minimalen Erkennungsort-Konzentrationen liegen für das 30-mer bei 5 nM, für das 111-mer bei etwa 0,5 nM. Diese Daten unterstützen eindrucksvoll die Hypothese, dass *EcoRII* kooperativ mit zwei spezifischen Erkennungsorten wechselwirken muß, um katalytisch aktiv zu sein. Im Gegensatz zu den Substraten mit nur einem *EcoRII*-Erkennungsort konvergiert die Spaltung des 111-mers mit zwei Erkennungsorten nicht gegen Null, sobald die minimale Erkennungsort-Konzentration unterschritten wird. Auch bei der sehr geringen Konzentration von 0,5 nM werden noch zwischen 50 und 60 % des Substrates gespalten. Dieser hohe Wert ist auf den Beitrag der intramolekularen Kooperativität von *EcoRII* mit zwei Erkennungsorten zurückzuführen. Bei höheren Oligonukleotidduplex-Konzentrationen wird die Spaltung darüber hinaus über die intermolekulare Wechselwirkung des Enzyms verstärkt.

2.2.2. Stöchiometrie des aktiven Enzym-Substrat-Komplexes

Die Frage war nun, aus welchen Komponenten der aktive Enzym-Substrat-Komplex besteht. Obwohl *EcoRII* in Lösung bevorzugt als Dimer vorliegt (Kosykh et al., 1982), ist die kooperative Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten auch durch Bindung eines *EcoRII*-Dimers pro Erkennungsort denkbar, was im aktiven Komplex dann zu einer tetrameren Proteinstruktur führen würde. Zur Beantwortung der Frage nach der Stöchiometrie des aktiven *EcoRII*-Substrat-Komplexes haben wir zunächst das Molekulargewicht von *EcoRII* mit und ohne Substrat durch Gelfiltration bestimmt. Das Molekulargewicht von *EcoRII* lag bei 85 kDa, was in etwa dem zwei-fachen Molekulargewicht der monomeren Untereinheit entspricht. Das bestätigt, dass *EcoRII* in Lösung als dimere Proteinstruktur vorliegt. In Gegenwart von Substrat-DNA konnten wir einen DNA-Protein-Komplex nachweisen, der mit einem Molekulargewicht von etwa 197 kDa aus einem *EcoRII*-Dimer (85 kDa) und zwei Substrat-DNA-Molekülen (2 x 45 kDa) zusammengesetzt sein könnte. Das Molekulargewicht des Komplexes war unabhängig von der

eingesetzten Substrat-DNA-Konzentration und unabhängig vom molaren Verhältnis von Substrat und Protein sowie von der Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen (12).

Das stöchiometrische Verhältnis von einem dimeren *EcoRII*-Molekül und zwei DNA-Molekülen im aktiven Komplex konnten wir auf unabhängige Weise durch Titration der dimeren *EcoRII*-Moleküle gegen eine konstante Konzentration von DNA-Substrat-Molekülen bestätigen. Es wurden molare Enzym-zu-Erkennungsorte Verhältnisse von 0,01 bis 8 getestet. Die effektivste Spaltung wird bei einem Verhältnis von einem dimeren *EcoRII*-Molekül pro 2-4 DNA-Erkennungsorte erreicht. Beginnend bei einem Verhältnis von 1, wenn theoretisch jeder *EcoRII*-Erkennungsort von einem dimeren *EcoRII*-Molekül besetzt ist, wird die *EcoRII*-Spaltung mit höheren Enzymkonzentrationen deutlich gehemmt. Equimolarität und Enzymüberschuß behindern demnach die Bildung des aktiven Komplexes. Die *EcoRII*-Hemmung durch Enzymüberschuß ist durch Zugabe entsprechender Substratmengen, die ein Enzym-zu-Erkennungsort Verhältnis von 0,5 wiederherstellen, reversibel und beweist, dass nicht der Enzymüberschuß *per se* zur Hemmung der *EcoRII*-Aktivität führt. Wir schlussfolgern aus diesen Experimenten, dass ein dimeres *EcoRII*-Molekül die gleichzeitige Wechselwirkung mit zwei spezifischen DNA-Erkennungsorten im aktiven Komplex bewerkstelligt (12).

Findet die kooperative Interaktion von *EcoRII* mit zwei verschiedenen Molekülen statt, so ist die Länge der DNA-Moleküle die kritische Größe – mindestens eines der beiden Moleküle muß klein genug sein, so dass die Bildung des aktiven Komplexes nicht sterisch behindert wird. Für die Interaktion mit zwei Erkennungsorten innerhalb eines DNA-Moleküls sind verschiedene Mechanismen denkbar, wie ein dimeres *EcoRII*-Molekül die Distanz zwischen benachbarten Erkennungsorten überwinden kann. Generell werden für derartige enzymatische Prozesse die ATP-abhängige DNA-Translokation und ATP-unabhängige DNA-“sliding” oder -“looping” Vorgänge diskutiert (Wang and Giaever, 1988; Dröge, 1994). Da die Aktivität von TypII-Restriktionsendonukleasen ATP-unabhängig ist, ist die DNA-Translokation eher unwahrscheinlich. Ein einfaches Experiment, um zwischen DNA-“sliding” oder DNA-“looping” unterscheiden zu können, ist die Platzierung eines DNA-bindenden Proteins zwischen zwei interagierende Erkennungsorte. Ein prozessiver Mechanismus, der eindimensional an der DNA entlang verläuft, sollte durch das gebundene Protein blockiert werden. Ein dreidimensionaler Prozess wie das DNA-“looping” sollte unbeeinflusst bleiben, vorausgesetzt, das gebundene

Protein ist klein genug bzw. der Abstand zwischen den Erkennungsorten groß genug. Unsere Experimente zeigten, dass ein Lac-Repressor, gebunden zwischen zwei *EcoRII*-Erkennungsorten im Abstand von 191 bp in einem linearen DNA-Molekül, keine Barriere für die kooperative Wechselwirkung von *EcoRII* mit den zwei Erkennungsorten darstellt. Im Gegensatz dazu blockiert der gebundene Lac-Repressor die essentielle Kooperation der TypIII-Restriktionsendonuklease *EcoP15* mit zwei ihrer invers orientierten Erkennungssequenzen. *EcoP15*-DNA Komplexe kommunizieren über einen ATP-abhängigen DNA-Translokationsmechanismus miteinander (Meisel et al., 1995). Auch Restriktionsendonukleasen, die sich durch lineare Diffusion an der DNA entlang bewegen, wie z.B. *EcoRI*, werden von gebundenen Proteinen oder von irregulären DNA-Strukturen aufgehalten (Jeltsch et al., 1994). Wir schlußfolgern aus unseren Daten, dass *EcoRII* die Kooperativität zwischen den beiden Erkennungsorten, zumindest in dem hier getesteten Abstand, durch einen Prozess herstellt, der DNA-“looping“ einschließt.

In welchem Maße wirkt sich nun der Abstand zwischen zwei *EcoRII*-Erkennungsorten auf die Fähigkeit des Enzyms zur kooperativen Wechselwirkung aus? Lineare DNA-Fragmente mit zwei *EcoRII*-Erkennungsorten in verschiedener Distanz zueinander wurden auf ihre Spaltbarkeit untersucht. Der funktionell relevante Abstand liegt zwischen den 5' Cytosinresten der beiden *EcoRII*-Erkennungsorte. Die Experimente wurden bei Substrat-Konzentrationen durchgeführt, die ausschließlich die intramolekulare Wechselwirkung von *EcoRII* mit zwei Erkennungsorten zulassen. Sind beide *EcoRII*-Erkennungsorte direkt benachbart, der Abstand beträgt dann 5 bp, liegt der Anteil der gespaltenen DNA bei etwa 26 %. Das bedeutet, dass *EcoRII* auch diese direkt nebeneinander liegenden Erkennungsorte als getrennte Erkennungsorte erkennt. Wird der Abstand auf 10 bp vergrößert, steigt die Spaltung auf 80 - 90 % an, die effizienteste intramolekulare DNA-Spaltung, die wir für *EcoRII* messen konnten. Der Abstand von 10 bp entspricht etwa einer helikalen DNA-Windung, so dass *EcoRII* wahrscheinlich beide Erkennungsorte von der gleichen Seite der Helix binden kann – eine offensichtlich optimale Konfiguration der kooperierenden Erkennungsorte. Wird dieser optimale Abstand von 10 bp verdoppelt bzw. verdreifacht, sinkt die Spalteffizienz auf 30 - 40 %. Bei Abständen von 31 bis 191 bp erreicht die DNA-Hydrolyse ein Plateau von 20 - 25 %. Bei einem Abstand von 952 bp werden nur noch 6 % des Substrates von *EcoRII* gespalten. Das entspricht

unseren früheren Beobachtungen an zirkulärer und linearer DNA, dass eine Distanz von etwa 1000 bp für die kooperative Wechselwirkung durch *EcoRII* kritisch ist (8). Alle Abstände, die 10 bp überschreiten, gehen wahrscheinlich mit größeren Distortionen der DNA im Enzym-Substrat-Komplex einher, wie z. B. DNA-Krümmung und „looping“. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein *EcoRII*-Dimer gleichzeitig zwei Erkennungsorte binden kann, wird also mit zunehmendem Abstand der Erkennungsorte in der DNA geringer.

Wir haben darüberhinaus beweisen können, dass die Orientierung der beiden kooperierenden Erkennungsorte innerhalb des DNA-Doppelstranges, die durch das zentrale A/T-Paar in der *EcoRII*-Erkennungssequenz gegeben ist, keinen Einfluß auf die *EcoRII*-Enzymaktivität hat.

2.3. Untersuchungen zur spezifischen DNA-Erkennung durch *EcoRII* (13-15)

2.3.1. Lokalisierung von zwei DNA-bindenden Regionen in *EcoRII* mit synthetischen Peptiden

Wie realisiert *EcoRII* den Kontakt mit zwei Erkennungsorten auf Aminosäureniveau? Können strukturelle Elemente in der *EcoRII*-Primärsequenz gefunden werden, die den Kontakt vermitteln? Dazu wurde die Aminosäuresequenz von *EcoRII* in Form überlappender membranfixierter synthetischer Peptide auf Bindung radioaktiv markierter Oligonukleotidduplexe mit einer *EcoRII*-Erkennungssequenz getestet. Diese Methode wurde erfolgreich zur Identifizierung von linearen und diskontinuierlichen Protein-Protein- (Kramer et al., 1997; Rüdiger et al., 1997; Reineke et al., 1998) und von Protein-Metall-Kontaktstellen (Malin et al., 1995) eingesetzt. Wir haben diese Methode für die Untersuchung von DNA-Protein-Kontakten adaptiert.

Die komplette *EcoRII*-Aminosäuresequenz lag in Form von 132 Dodecapeptiden auf einer Zellulose-Membran vor, wobei benachbarte Peptide um neun Aminosäuren überlappten. Unter stringenten kompetitiven Bedingungen (Anwesenheit von Mg^{2+} und 10^4 -fachem molarem Überschuss einer unmarkierten unspezifischen Kompetitor-DNA) zeigten fünf Dodecapeptide eine besonders hohe spezifische Affinität zur Erkennungssequenz. Wir konnten zwei spezifische DNA-bindende Regionen in der *EcoRII*-Aminosäuresequenz identifizieren. Eine liegt im Bereich der Aminosäuren 88 bis 102 NH_2 -RHF $GKTRNEKRITRW$ (Bindungsregion I) und eine zweite im Bereich der Aminosäuren 256 bis 273 NH_2 -NSVSNRRKSRAGKSLELH

(Bindungsregion II). Die Regionen weisen das Consensus-Motiv KXRXXK (fett gedruckt) auf, das in der *EcoRII*-Aminosäuresequenz ansonsten kein weiteres Mal vorkommt (13).

2.3.2. Identifizierung der für die Peptid-DNA Bindung kritischen Aminosäurereste durch Substitutionsanalyse

Von den zwei DNA-bindenden Peptiden wurden Substitutionsanaloga synthetisiert, wobei jede Position der Originalsequenz durch jeweils alle anderen essentiellen Aminosäuren ersetzt wurde. Um den Einfluß einer Aminosäuresubstitution auf die DNA-Bindung des Peptids beurteilen zu können, wurde die Bindungskapazität der Originalsequenz, die auf Grund des Syntheschemas und der Länge des Peptids, 30mal auf der Membran vorkommt, durch die Ermittlung des Mittelwertes +/- dreifache Standardabweichung bestimmt. Alle Werte, die nicht in diesen Bereich fielen, wurden als signifikant betrachtet. Es fiel auf, dass in beiden DNA-Bindungsregionen bestimmte basische Aminosäuren von Bedeutung sind. Zu beachtlichen Effekten auf die DNA-Bindungsfähigkeit der Peptide kam es nach Substitution der Aminosäuren Lysin bzw. Arginin an den Positionen 92, 94, 97 und 98 in Bindungsregion I, und noch stärker, an den Positionen 263, 265 und 268 in Bindungsregion II.

2.3.3. Austausch der kritischen Lysinreste verändert die DNA-Bindung oder die Katalyse des *EcoRII*-Proteins

Entsprechend der Ergebnisse der Substitutionsanalyse der DNA-bindenden Peptide haben wir die Lysine in beiden Bindungsregionen der *EcoRII*-codierenden DNA-Sequenz mittels ortsspezifischer Mutagenese durch neutrale Alanin- oder saure Glutaminsäurereste ausgetauscht. Wir erhielten die folgenden Mutanten: K92A/K97A, K92E/K97E, K263A/K268A, K263E/K268E, und K92A/K97A/K263A/K268A, K92A/K97A/K263E/K268E, K92E/K97E/K263A/K268A und K92E/K97E/K263E/K268E. Nach Expression mit N-terminalem 6 x His-Schwanz in *Escherichia coli*-Zellen wurden die Enzym-Mutanten über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Enzymmutanten eluierten unter den gleichen Bedingungen von der Säule wie der *EcoRII*-Wildtyp (WT), reagierten im Westernblot mit polyklonalen *EcoRII*-spezifischen Antikörpern und zeigten im Vergleich zu *EcoRII*-WT keine bemerkenswerten Veränderungen der Sekundärstruktur.

Die DNA-Bindung der *EcoRII*-Mutanten wurde durch K_D -Wertbestimmung im DNA-Gelshift und ihre katalytische Aktivität durch Spaltung linearisierter pBR322-DNA beurteilt. Der Austausch beider Lysine gegen Alanin in Bindungsregion I führt zu einer etwa 6-fachen Verringerung der DNA-Bindung. Die K_D -Werte liegen bei 32 nM im Vergleich zu 5 nM für *EcoRII*-WT. Die Einführung von Glutaminsäure an diesen Positionen verhindert die DNA-Bindung fast vollständig, der K_D -Wert liegt deutlich über 250 nM. Im Gegensatz dazu zeigten die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen in Bindungsregion II K_D -Werte wie der WT. In den *EcoRII*-Mutanten, die in beiden Bindungsregionen mutiert wurden, entsprechen die K_D -Werte etwa denen der nur in Bindungsregion I veränderten Enzym-Mutanten: nach Austausch der Lysine gegen Alanine liegt der K_D -Wert bei etwa 45-90 nM; nach Austausch der Lysine gegen Glutaminsäure bei >250 nM. Die K_D -Werte der Mutanten werden deutlich von den Aminosäuresubstitutionen in der Bindungsregion I bestimmt. Die Mutationen in Bindungsregion II scheinen keinen, mit unserem System messbaren Beitrag zur DNA-Bindung der *EcoRII*-Mutanten zu leisten.

Im Gegensatz zu Bindungsregion I, die scheinbar in der DNA-Bindung der *EcoRII*-Mutanten eine dominierende Rolle spielt, aber nicht deren katalytische Aktivität beeinflusst, führt der Austausch beider Lysinreste in Bindungsregion II zu katalytisch inaktiven Enzym-Mutanten. Wir haben darüber hinaus die Aktivierbarkeit durch sequenz-spezifische Oligonukleotidduplexe (wie sie vom *EcoRII*-WT bekannt ist) und die Fähigkeit der *EcoRII*-Mutanten zur Restriktion von λ -Phagen *in vivo* getestet. Im Gegensatz zu *EcoRII* WT und den *EcoRII*-Mutanten in Bindungsregion I, sind die *EcoRII*-Mutanten in Bindungsregion II nicht mehr durch Oligonukleotidduplexe *in trans* zu aktivieren, was die Verwicklung dieser Region in die DNA-Hydrolyse unterstreicht. Das Verhalten der exprimierten Enzymmutanten *in vivo* bei der Restriktion des Bakterienvirus λ entspricht dem der gereinigten Proteine: K92/97A restringiert die Vermehrung des Virus um etwa vier Größenordnungen ebenso wie *EcoRII*-WT. Mit der Einführung der Glutaminsäurereste anstelle der Lysine an den Positionen 92 und 97 verliert *EcoRII* einen bedeutenden Teil seiner DNA-Bindungsfähigkeit und die λ -Restriktion sinkt von vier auf eine Größenordnung. Die Mutanten K263/268A und K263/268E sind zwar *in vitro* katalytisch inaktiv, hemmen aber die Virusvermehrung *in vivo* noch um ein bis zwei Größenordnungen. Möglicherweise können diese *EcoRII*-Mutanten unter den physiologischen

Bedingungen in der Zelle ihre katalytische Aktivität teilweise zurückgewinnen oder sie wirken wegen ihrer effektiven DNA-Bindung wie Repressoren und hemmen auf diesem Wege die virale Genexpression. Die Mutanten mit Veränderungen in beiden Bindungsregionen können λ -Bakteriophagen nicht mehr restringieren.

2.3.4. Sequenzvergleiche identifizieren ähnliche Bindungsmotive in anderen Restriktionsendonukleasen

Sequenzvergleiche identifizierten Bindungsregion II-verwandte Sequenzbereiche in verschiedenen anderen Restriktionsendonukleasen, die als einzige Gemeinsamkeit G:C oder C:G Basenpaare in ihren ansonsten verschiedenen Erkennungssequenzen enthalten. Größte Sequenz-Übereinstimmung fanden wir zwischen *EcoRII* (5'/CCWGG), *SsoII* (5'/CCNGG) und *ScrFI* (5'CC/NGG), die eine degenerierte *EcoRII*-Sequenz erkennen (Striche kennzeichnen die Spaltpositionen). Die Homologie ist besonders bedeutsam, da sie auf die *EcoRII* DNA-Bindungsregion II begrenzt ist (13) – eine Tatsache, die die Rolle dieser Proteinregion für die sequenzspezifische Substraterkennung unterstreicht.

Sequenzähnlichkeiten zwischen *EcoRII*, *SsoII* und *PspGI* (5'CCWGG), einem neu isolierten *EcoRII*-Isoschizomer, wurden auch von Morgan et al. (1998) beschrieben. Die Autoren identifizierten in den drei Enzymen einen Bereich von 87 Aminosäuren, der auch die Bindungsregion II von *EcoRII* einschließt, und spekulierten über eine Rolle dieses Bereiches als DNA-erkennendes Motiv für CCXGG-Sequenzen.

Durch umfangreiche Sequenzvergleiche und Analyse kristallographischer Daten wurden kürzlich eine weitere DNA-bindende Region sowie ein potentiell aktives Zentrum im C-terminalen Bereich von *EcoRII* vorhergesagt (Pingoud et al., 2002; Tamulaitis et al., 2002).

Für die DNA-Bindungsregion I im N-terminalen Bereich des *EcoRII*-Proteins konnten wir bisher keine Ähnlichkeit zu einem anderen Protein finden.

2.3.5. Eine monomere *EcoRII*-Untereinheit kann eine DNA-Erkennungssequenz binden

Die Konserviertheit bestimmter Aminosäuren in der DNA-Bindungsregion II von *EcoRII*, *PspGI* und *SsoII* sowie der postulierte Zusammenhang mit der sequenz-spezifischen DNA-Erkennung durch diese Restriktionsendonukleasen warf die Frage auf, ob sich durch Austausch einzelner, zwischen *EcoRII* und *SsoII* nicht konservierter Aminosäuren, die *EcoRII*-DNA-

Spezifität von 5'CCWGG auf 5'CCNGG verändern läßt. Die Spezifitätsänderung konnten wir auf diesem Wege nicht erreichen, aber wir erhielten durch den Austausch des unpolaren Valin an Position 258 von *EcoRII* gegen das polare Asparagin, das sich an der entsprechenden Position in *SsoII* befindet, eine *EcoRII*-Mutante (V258N), bei der die Veränderung dieser einzelnen Aminosäure zur Entkopplung der DNA-Erkennung von kooperativer DNA-Interaktion und Spaltung führte (14).

Die Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit der *EcoRII*-Mutante V258N in Gelshift-Experimenten und die Darstellung des DNaseI-Footprints ergab, dass die *EcoRII*-Mutante ebenso effizient an spezifische DNA bindet wie *EcoRII*-WT. Beide K_D -Werte liegen bei etwa 5 nM. Die V258N-DNA Komplexe zeigten aber eine deutlich höhere Laufgeschwindigkeit als die vom *EcoRII* WT gebildeten Komplexe. Nach spezifischer DNA-Bindung zeigten sich für *EcoRII* WT und V258N symmetrische DNaseI-Footprints von 16 bis 18 bp.

Die Bestimmung des relativen Molekulargewichts von V258N mit nativer Gelelektrophorese bestätigte, dass die Mutante in Lösung zum großen Teil als Monomer, *EcoRII* WT wie erwartet als Dimer vorliegt. Die durch analytische Ultrazentrifugation ermittelten Dissoziationskonstanten bewiesen letztlich für V258N eine im Vergleich zum WT-Enzym etwa 350-fach verringerte Fähigkeit zu dimerisieren. Die Aminosäureposition Val²⁵⁸ ist demnach in einer Region von *EcoRII* lokalisiert, die für die Ausbildung des Kontakts der monomeren Untereinheiten verantwortlich ist.

Die Spaltaktivität von V258N beträgt nur noch etwa 16 % der Aktivität des WT-Enzyms. Da die DNA-Bindung von V258N ebenso wie die Verteilung der Sekundärstrukturen unbeeinträchtigt sind, ist offensichtlich der destabilisierte Protein-Protein-Kontakt für die verringerte katalytische Aktivität verantwortlich. Diese Daten bestätigen unsere Hypothese, dass der katalytisch aktive Komplex aus einem Dimer und zwei DNA-Substrat-Molekülen zusammengesetzt ist und dass Aminosäuren, die zur DNA-Bindung, Katalyse und Dimerisierung beitragen, eng vernetzt sind.

V258N ist die erste beschriebene monomere Mutante einer Restriktionsendonuklease, bei der die spezifische DNA-Bindungsfähigkeit erhalten geblieben ist. Wir schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass eine monomere Untereinheit der homodimeren *EcoRII*

Restriktionsendonuklease die strukturellen Komponenten enthält, die zur spezifischen Bindung einer *EcoRII*-Erkennungssequenz hinreichend sind.

2.3.6. Transmissionselektronenmikroskopie zeigt durch *EcoRII* induzierte DNA-Schlaufen nach Interaktion mit zwei Erkennungsorten

Die Fähigkeit des dimeren *EcoRII*-Moleküls, nach gleichzeitiger Bindung von zwei Erkennungsorten spezifische DNA-Schlaufen auszubilden, konnten wir mittels Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar machen. Wir untersuchten dazu die Interaktion von *EcoRII* mit einer 1202 bp langen linearen DNA mit zwei Erkennungsorten im Abstand von 191 bp. Die asymmetrische Anordnung der beiden Erkennungsorte im DNA-Molekül ermöglichte die Unterscheidung der beiden Enden und damit die Einschätzung der Spezifität der entstandenen DNA-Schlaufen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen bildete *EcoRII* mit etwa 20 - 25 % der DNA-Moleküle eine spezifische Schlaufe zwischen den Erkennungsorten. Im Gegensatz zum *EcoRII*-WT fanden wir für die monomere V258N nur 3 - 6 % DNA-Schlaufen. Die Daten zeigen, dass die Ausbildung der *EcoRII*-induzierten DNA-Schlaufen an eine intakte dimere Proteinstruktur gebunden ist.

2.3.7. "Photocross-linking"-Experimente identifizieren einen asymmetrischen direkten Kontakt des *EcoRII*-Proteindimers zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz

Obwohl wir mit Hilfe von Membran-gebundenen Peptiden zwei DNA-bindende Regionen innerhalb der *EcoRII*-Aminosäuresequenz identifizieren und deren funktionelle Bedeutung bestätigen konnten, ließen diese Daten noch keine Schlussfolgerung über direkte Kontakte einzelner Aminosäuren mit den Basen der Erkennungssequenz zu. Insbesondere konnten wir keine Aussage darüber treffen, ob die Lysine im Konsensus-Motiv oder andere Aminosäuren der beiden Bindungsregionen Kontakte zu den Basen der Erkennungssequenz oder zum Phosphatrückgrat der DNA herstellen oder aber ob sie entscheidend für die Geometrie und Ladungsverteilung in den Bindungsregionen sind. Es war ebenso unklar, ob der Kontakt von *EcoRII* zur DNA-Erkennungssequenz in beiden Strängen identisch ist oder nicht.

Um Aminosäuren zu identifizieren, die direkt und spezifisch mit den Basen der *EcoRII*-Erkennungssequenz in Kontakt sind, haben wir *EcoRII* und verschiedene Oligonukleotidduplexe mit einem *EcoRII*-Erkennungsort durch einen Helium/Cadmium-Laser photochemisch vernetzt.

In jedem Oligonukleotidduplex wurde jeweils eine Base der Erkennungssequenz substituiert – Cytosin durch 5-Joddesoxycytidin (Y) oder Thymin, Adenin und Guanin durch 5-Joddesoxyuridin (X). Beide Substituenten lassen sich durch UV-Licht der Wellenlänge 325 nm anregen, um mit elektronenreichen Aminosäuren wie Phe, Tyr, Trp, His oder Met, die sich in unmittelbarer Nähe der DNA-Erkennungssequenz befinden, zu vernetzen. Die höchste Vernetzungsrate von etwa 45% erhielten wir im Falle der Substitution des 5'C im 5'CCAGG-Strang durch Y. Deutlich geringere Vernetzungsraten von etwa 5 % wurden erreicht, wenn das zentrale A oder T durch X substituiert war. Alle anderen Substitutionen in der *EcoRII*-Erkennungssequenz führten wegen gestörter Bindung oder wegen wahrscheinlich nicht vorhandener reaktiver Aminosäuren in entsprechender Nähe und Orientierung zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz nicht zur Bildung eines nachweisbaren DNA-*EcoRII* Vernetzungsproduktes (15).

Die Restriktionsendonuklease *EcoRII* stellte die wichtigste spezifische Vernetzung zum 5'C des 5'CCAGG-Stranges, nicht aber zum 5'C des 5'CCTGG-Stranges her, obwohl *EcoRII* das entsprechend modifizierte Oligonukleotidduplex (5'YCTGG) binden kann. Das *EcoRII*-Vernetzungsmuster mit den Basen seiner doppelsträngigen DNA-Erkennungssequenz ist damit ein asymmetrisches. Wir konnten zeigen, dass die beobachtete Asymmetrie in der Erkennung der beiden DNA-Stränge durch *EcoRII* nicht durch Nachbarschaftsbasen verursacht wird. Wir schlussfolgern daraus, dass die lokale Asymmetrie der *EcoRII*-Erkennungssequenz im zentralen A/T-Paar für die Asymmetrie des *EcoRII*-Vernetzung verantwortlich ist. *EcoRII* unterscheidet sich damit deutlich von den *TypII*-Restriktionsendonukleasen, die ihre Erkennungssequenz in symmetrischer Weise erkennen und demnach auch ein symmetrisches Vernetzungsmuster zeigen sollten (Pingoud and Jeltsch, 2001).

Das *EcoRII*-Peptid, das die Vernetzung mit dem 5'C des 5'CCAGG-Stranges herstellt, wurde durch Vergleich der RT-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography)-Chromatogramme der durch Trypsinbehandlung des mit der DNA vernetzten *EcoRII* und des freien Enzyms entstandenen Peptidmischungen ermittelt. Die Sequenz des relevanten Peptids wurde durch Edman-Abbau bestimmt. Das vernetzte Peptid entspricht den Aminosäuren 25 - 49 von *EcoRII* LSANDTGATG GHQVGLYIPS GIVEK.

Der Austausch der energiereichen Aminosäuren dieses Peptids, His³⁶ und Tyr⁴¹, durch Ala mittels ortsspezifischer Mutagenese in *EcoRII* und die Expression der entsprechenden *EcoRII*-Mutanten bewiesen, dass Tyr⁴¹ die Aminosäure innerhalb des Peptids ist, die mit dem 5'C des 5'CCAGG-Stranges vernetzt ist. Tyr⁴¹ spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle für die basen-spezifische DNA-Erkennung durch *EcoRII* (15).

2.4. Untersuchungen zur Domänenorganisation von *EcoRII* (16)

2.4.1. Limitierte Proteolyse von *EcoRII* zeigt zwei stabil gefaltete funktionelle Domänen

Insbesondere durch unsere Mutationsanalysen kennen wir Aminosäuren von *EcoRII*, die für DNA-Bindung, -Katalyse und Protein-Protein-Kontakte funktionell wichtig sind (13-15, unveröffentlichte Ergebnisse). Die durch die Mutationen hervorgerufenen veränderten Eigenschaften des Enzyms suggerierten die Zusammensetzung aus mindestens zwei funktionellen Domänen.

Um Informationen über stabil gefaltete Proteindomänen zu erhalten, haben wir *EcoRII* mit und ohne DNA einer limitierten Proteolyse durch die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin unterzogen. Die Zuordnung der proteolytischen Fragmente zu einer definierten *EcoRII*-Aminosäureposition wurde nach N-terminaler Sequenzierung der proteolytischen Fragmente unter Einbeziehung ihrer molekularen Massen möglich.

Bei proteolytischem Abbau von *EcoRII* durch sowohl Trypsin als auch Chymotrypsin in Gegenwart von spezifischer DNA zeigten sich stabile Fragmente, die dem N-Terminus von *EcoRII* zugeordnet werden konnten. Die Fragmente, die ohne spezifische DNA den Proteasen am längsten widerstehen, gehören in die C-terminale Hälfte der *EcoRII*-Restriktionsendonuklease. Wir schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass *EcoRII* sehr wahrscheinlich aus zwei Domänen besteht, die in etwa der N- bzw. C-terminalen Hälfte des Proteins entsprechen. Die N-terminale Domäne scheint für die spezifische Substrat-Bindung von Bedeutung zu sein, da sie in Gegenwart spezifischer DNA während der Proteolyse stabilisiert wird.

2.4.2. Expression der einzelnen *EcoRII*-Domänen erlaubt die Zuweisung distinkter Funktionen

Die Frage war nun, ob die identifizierten proteolytischen Fragmente tatsächlich stabilen funktionellen Domänen von *EcoRII* entsprechen. Wir haben dazu die entsprechenden *EcoRII*-codierenden DNA-Bereiche kloniert und exprimiert. Die trunkierten Proteine beinhalteten die N-terminalen Aminosäuren 4-192 (*EcoRII*-N) und die C-terminalen Aminosäuren 173-404 (*EcoRII*-C).

EcoRII-N bindet spezifisch, mit einem K_D -Wert, der nur eine Größenordnung schlechter ist als der des kompletten Proteins, an DNA. Im Gegensatz zu *EcoRII*-N, konnten wir für *EcoRII*-C keine spezifische DNA-Bindung im hier verwendeten Gelshift nachweisen.

Obwohl *EcoRII*-N spezifisch an DNA bindet, ist es nicht in der Lage, die DNA spezifisch oder unspezifisch zu spalten. Im Gegensatz zu *EcoRII*-N, spaltet *EcoRII*-C linearisierte pBR322-DNA spezifisch und sogar mit einer etwa 100-fach höheren Reaktionsgeschwindigkeit als *EcoRII*-WT. Diese hohe Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der einer orthodoxen *TypII*-Restriktionsendonuklease, z.B. der des *EcoRII*-Isoschizomers *BstNI*. *EcoRII*-C enthält offensichtlich alle essentiellen strukturellen und funktionellen Komponenten einer *TypII*-Restriktionsendonuklease, um jeden einzelnen Erkennungsort innerhalb einer DNA zu spalten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir die Spaltung der genomischen DNA des Bakterienvirus T3 mit *EcoRII*-C. T3-DNA wird von *EcoRII*-WT nicht gespalten (2). Der Grund dafür liegt in der notwendigen simultanen Interaktion von *EcoRII* mit zwei Erkennungsorten. Die fast 40.000 bp lange lineare Virus-DNA trägt nur drei *EcoRII*-Erkennungsorte und kann deshalb nicht von *EcoRII*-WT geschnitten werden. Zu unserer Überraschung spaltete *EcoRII*-C T3-DNA ebenso effizient wie die *TypII*-Restriktionsendonuklease *BstNI*, während T3-DNA unter den gleichen Bedingungen durch *EcoRII*-WT nicht gespalten werden kann. *EcoRII*-C stellt offensichtlich eine Endonuklease-ähnliche Domäne dar. Die Tatsache, dass *EcoRII*-C DNA spezifisch spaltet, setzt voraus, dass es auch spezifisch an die DNA binden kann. Vermutlich ist die Stabilität der gebildeten Komplexe zu gering, um sie in unseren Gelshift-Experimenten darstellen zu können.

EcoRII besteht demnach aus zwei Domänen, die spezifisch und unabhängig voneinander DNA binden können.

2.5. Erste Versuche zur Kristallisierung von *EcoRII* und *EcoRII*-Mutanten (17)

Für die Aufklärung der strukturellen Grundlage der *EcoRII*-DNA Wechselwirkung wäre die Röntgenkristallstrukturanalyse der Restriktionsendonuklease *EcoRII* und des Komplexes mit der DNA besonders wertvoll.

Die erste Kristall- und Ko-Kristallstruktur einer TypII-E-Restriktionsendonuklease, *NaeI*, wurde erst kürzlich aufgeklärt (Huai *et al.*, 2000; 2001). Die 2,5 Å Kristallstruktur von *NaeI* im Komplex mit einem 17 bp langen DNA-Substrat zeigte, dass zwei DNA-Moleküle an zwei unterschiedliche Domänen in *NaeI* binden – eine Besonderheit verglichen mit der Bindung eines DNA-Moleküls pro Dimer durch orthodoxe TypII-Restriktionsendonukleasen. Es wäre sehr interessant zu sehen, ob *EcoRII* ähnlich aufgebaut ist.

EcoRII wurde erstmals in kubischer Form kristallisiert (Karpova *et al.*, 1999). Die Kristalle, die in Abwesenheit von Mg^{2+} gebildet wurden, konnten nur bis 4 Å aufgelöst werden. Wir haben nun His₆-*EcoRII* verwendet und in Anwesenheit von Mg^{2+} Kristalle in monokliner Form erhalten, die bis zu 2,8 Å aufgelöst werden konnten (17). Von einer *EcoRII*-Mutante, R88A, konnten sogar monokline Kristalle mit einer Auflösung von 2,1 Å gewonnen werden. Alle vorläufigen Daten sprechen für die Existenz von zwei monomeren *EcoRII*-Untereinheiten in der Elementarzelle des Kristalls. Gegenwärtig laufen die Arbeiten zur Strukturaufklärung.

2.6. Bedeutung der strukturellen Details für die Funktion der Restriktionsendonuklease *EcoRII*

2.6.1. Modell des molekularen Reaktionsmechanismus von *EcoRII*

Die Verknüpfung unserer strukturellen und funktionellen Daten führte zu einem Modell der *EcoRII*-Struktur und seiner Interaktion mit der DNA: *EcoRII* existiert in Lösung als stabile homodimere Struktur. Das überdurchschnittlich große Molekulargewicht des *EcoRII*-Dimers von etwa 2 x 46,6 kDa im Vergleich zu anderen TypII-Restriktionsendonukleasen (ca. 2 x 30 kDa) suggeriert, dass *EcoRII* aus mehr als einer Proteindomäne bestehen könnte. Unsere Proteolyse-Experimente beweisen, dass ein *EcoRII*-Monomer aus zwei stabil gefalteten Proteindomänen besteht, die in etwa die beiden Hälften des Proteins ausmachen – einer N-terminalen Domäne *EcoRII*-N (Aminosäuren 1-190) und einer C-terminalen Domäne *EcoRII*-C (Aminosäuren 173-404). Jede der beiden *EcoRII*-Domänen, die vermutlich über einen kurzen

flexiblen „Arm“ verbunden sind, verfügt über eine DNA-bindende Region mit einem an basischen Aminosäuren reichen Konsensus-Motiv und bindet spezifisch und unabhängig an das DNA-Substrat. Der Beitrag der N-terminalen Domäne zur DNA-Substrataffinität des kompletten Enzyms scheint der primär entscheidende zu sein, da die gemessenen K_D -Werte von *EcoRII*-N und dem kompletten Enzym nur um eine Größenordnung differieren. Im N-terminalen Bereich von *EcoRII* liegt auch die Aminosäure Tyr⁴¹, die im direkten Kontakt zum 5' C des 5'CCAGG-Stranges der Erkennungssequenz steht. Obwohl DNaseI-Footprinting- und Gelshift-Untersuchungen zeigen, dass *EcoRII* den 5'CCTGG-Strang der Erkennungssequenz ebenso wie den 5'CCAGG-Strang bindet, konnten wir eine spezifische Vernetzung mit diesem Teil der Erkennungssequenz nicht nachweisen.

Die C-terminale Domäne von *EcoRII* beinhaltet alle strukturellen und funktionellen Komponenten einer orthodoxen TypII-Restriktionsendonuklease. Im C-terminalen Teil von *EcoRII* liegen nach unseren eigenen Daten und ebenso nach strukturellen Vorhersagen anderer Autoren (Pingoud et al., 2002; Tamulaitis et al., 2002) katalytisch wichtige Sequenz-Motive. Im C-terminalen Teil konnten wir auch entscheidende Protein-Protein-Kontakte lokalisieren (Petter, 2001) – eine Tatsache, die verdeutlicht, dass Aminosäuren, die für die hochspezifische DNA-Bindung und -Katalyse, aber auch für die Dimerisierung verantwortlich sind, notwendigerweise ein enges Netzwerk bilden. Wir konnten experimentell zeigen, dass die Enzym-Aktivität von *EcoRII* an eine intakte Dimer-Struktur gebunden ist. *EcoRII*-C liegt in Lösung als Dimer vor und kann spezifisch einzelne Erkennungsorte in beiden DNA-Strängen schneiden. Dieser überraschende Befund beantwortete gleichzeitig eine bis dahin ungeklärte Frage, nämlich wie die beiden DNA-Bindungsregionen innerhalb der Aminosäuresequenz von *EcoRII* in den zwei zu erwartenden Substratbindungsstellen des Proteindimers organisiert sind: ein Substratbindungsstelle von *EcoRII* wird offensichtlich von den beiden C-terminalen Domänen, der zweite von den beiden N-terminalen Domänen gebildet. Da das aktive Zentrum von *EcoRII* in der C-terminalen Domäne liegt, wird der Erkennungsort des hier gebundenen DNA-Doppelstranges in einem Bindungsereignis endonukleolytisch gespalten. Das durch die beiden N-terminalen Domänen des *EcoRII*-Dimers gebundene DNA-Molekül fungiert als Aktivator bzw. Effektor und wird nach unserem bisherigen Kenntnisstand nicht geschnitten. Innerhalb der *EcoRII*-Aminosäuresequenz können also zwei unterschiedliche Peptide, die zwei nicht

identische Substratbindungsorte bilden, mit ein und derselben DNA-Erkennungssequenz interagieren.

Die Entscheidung, welches DNA-Molekül am N-terminalen, und welches am C-terminalen Substratbindungsort gebunden wird, fällt mehr oder weniger zufällig, wobei wir den Einfluß von Nachbarschaftsbasen des Erkennungsortes auf die Bindung an den einen oder anderen Substratbindungsort von *EcoRII* nicht völlig ausschließen können. Determiniert ist aber, dass beide Substratbindungsorte am *EcoRII*-Dimer besetzt sein müssen und dass nur das am C-terminalen Substratbindungsort gebundene DNA-Molekül gespalten werden kann. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide DNA-Bindungsorte gleichzeitig okkupiert sind, hängt von der DNA-Konzentration und -Länge oder vom Abstand zweier Erkennungsorte *in cis* ab. Sind in einem Reaktionsansatz DNA-Moleküle verschiedener Länge und Konzentrationen vorhanden, z.B. wenn die Spaltung von hochmolekularer T3-DNA durch einen molaren Überschuß synthetischer Oligonukleotidduplexe stimuliert wird, so ist die bevorzugte Bindung der kurzen und im Überschuß vorhandenen Oligonukleotidduplexe an den Effektor-Bindungsort denkbar, da er über eine um Größenordnungen höhere DNA-Bindungsaffinität verfügt als der Substratbindungsort an den C-Termini. Sind nur synthetische Oligonukleotidduplexe in der Reaktion, so können sie gleichermaßen Effektor und Substrat sein. Das gilt offensichtlich nicht für hochmolekulare DNA, wie z.B. T3- oder T7-Genome. Die beiden Substratbindungsorte von *EcoRII* können, wahrscheinlich aus sterischen Gründen oder wegen der geringen Dichte an *EcoRII*-Erkennungsorten in den DNA-Molekülen, nicht gleichzeitig zwei dieser großen DNA-Moleküle binden. Denkbar ist auch, dass die Bindung prinzipiell möglich, der gebildete Komplex aber zu instabil ist.

2.6.2. *EcoRII* – eine Restriktionsendonuklease auf dem Weg zu neuen Funktionen?

Wir haben mit *EcoRII*-C eine Restriktionsendonuklease entwickelt, die im Gegensatz zu *EcoRII*-WT auch DNA-Substrate mit einzelnen Erkennungsorten spaltet. *EcoRII*-C spaltet diese Substrate unabhängig von einer zweiten Erkennungssequenz. Das bedeutet, dass wir erstmals eine Restriktionsendonuklease mit neuer DNA-Spezifität erhalten haben. Während *EcoRII*-WT spezifische Kontakte zur Erkennungssequenz 5'CCWGG-(X)_n-CCWGG herstellen muß, um aktiv zu sein, ist für *EcoRII*-C mit 5'CCWGG nur die Hälfte der Kontakte essentiell.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Verkürzung von Restriktionsendonukleasen, die die Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten benötigen, eine generelle experimentelle Strategie sein könnte, um deren katalytische Aktivität zu verbessern.

Die C-terminale Domäne von *EcoRII*, die an sich eine aktive TypII-Restriktionsendonuklease ist, könnte im Verlaufe der Evolution eine zusätzliche DNA-bindende Domäne und damit eine neue Proteinfunktion akquiriert haben. Die neue Funktion besteht in der gleichzeitigen Wechselwirkung mit zwei Kopien der Erkennungssequenz 5'CCWGG und reduziert gleichzeitig die endonukleolytische Aktivität des Enzyms.

Dass *EcoRII* mit zwei DNA-Sequenzen gleichzeitig wechselwirken muß, könnte eine Verbindung zu Enzymen aufzeigen, die in der Zelle an Prozessen wie DNA-Transposition und -Rekombination beteiligt sind. In der Tat haben Sequenzvergleiche konservierte, funktionell bedeutsame Aminosäuren in *EcoRII* und der Integrase-Familie der ortsspezifischen Rekombinasen gefunden (Topal und Conrad, 1993; Nunes-Düby et al., 1998). In den letzten Jahren wurde die Konservierung von Restriktionsendonuklease-ähnlichen Strukturen in einer Reihe von Enzymen beschrieben, die an Prozessen wie DNA-Transposition, -Rekombination und -Reparatur in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaea beteiligt sind (Kovall und Matthews, 1998; Ban und Yang, 1998; Hickman et al., 2000; Tsutakawa und Morikawa, 2001; Yang et al., 1999; Daiyasu et al., 2000; Wah et al., 1997). Das könnte darauf hinweisen, dass sich diese mit der DNA interagierenden Enzyme möglicherweise vor sehr langer Zeit von einer gemeinsamen Nuklease-Struktur divergent entwickelt haben. Ausgehend von einer evolutionären Verwandtschaft zwischen Restriktionsendonukleasen und verschiedenen DNA-prozessierenden Enzymen könnte man spekulieren, dass die Akquirierung einer zusätzlichen DNA-bindenden Domäne durch *EcoRII* ein erster Schritt einer Restriktionsendonuklease auf dem Weg zu Proteinfunktionen ist, die über die Spaltung von Phosphodiesterbindungen hinausgehen.

Die beschriebene strukturelle Homologie zwischen diesen Enzymen spricht deutlich für eine Verbindung zwischen sequenzspezifischer DNA-Rekombination bzw. -Transposition und Restriktionsendonukleasen. Eine Verbindung, die möglicherweise in der biologischen Funktion der R/M-Systeme begründet ist. Neben der allgemein akzeptierten Erklärung, dass R/M-Systeme in Bakterienzellen existieren, um die Infektion durch Bakterienviren und andere molekulare Parasiten abzuwehren (Bickle und Krüger, 1993), werden seit einiger Zeit weitere

Hypothesen diskutiert, die die Entstehung und Erhaltung der zahlreichen R/M-Systeme im Laufe der Evolution erklären könnten (Naito et al., 1995; Arber, 2000; Kobayashi, 2001). Während genetische Stabilität für das Überleben eines Individuums bzw. einer Population auf kurze Sicht essentiell ist, ist es die genetische Variabilität auf längere Sicht. R/M-Systeme erfüllen beide Ansprüche gleichermaßen (Bickle and Krüger, 1993). Arber (2000) postuliert die Existenz sogenannter „Evolutionsgene“ und bezeichnet die R/M-Systeme, gemeinsam mit den Reparaturgenen, als „Frequenzmodulatoren der genetischen Variation“ – einerseits restringieren sie die Aufnahme fremden genetischen Materials auf ein für die Zelle tolerierbares Maß, andererseits produzieren sie mit den DNA-Restriktionsfragmenten potentiell rekombinationsfähiges Material, das ins Genom der Zelle aufgenommen werden kann. Die Anhäufung genomischer Sequenzdaten und deren Vergleich belegt darüber hinaus eindrucksvoll die Beweglichkeit von R/M-Systemen innerhalb eines Genoms und zwischen verschiedenen Genomen. Diese Ereignisse scheinen nicht selten das Arrangement genomischer Sequenzen zu verändern (Arber, 2000; Kobayashi, 2001).

Eine alternative Hypothese (Naito et al., 1995) betrachtet die R/M-Systeme als „egoistische“ genetische Elemente, ähnlich den Viren oder den Transposons. R/M-Systeme sichern ihr Fortbestehen innerhalb einer Population auf Kosten der Wirtszelle, indem sie sie töten, sofern die Wirtszelle sie eliminiert. Diese Beobachtung wurde nur für die R/M-Systeme des Typ II gemacht (Kobayashi, 2001). Der Verlust der komplexeren Typ I R/M-Systeme scheint der Wirtszelle dagegen keine Probleme zu bereiten (Murray, 2002). Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob R/M-Systeme tatsächlich mehr Funktionen erfüllen als bisher angenommen.

Die Akquirierung neuer Proteindomänen, entweder durch den vorausgesagten häufigen horizontalen Gentransfer der R/M-Gene verbunden mit DNA-Umordnungen oder durch die Aufnahme von DNA-Restriktionsfragmenten, ist zweifellos eine effiziente evolutionäre Strategie, um Proteine mit neuen Funktionen zu erhalten. Untersuchungen an diversen Protein-Superfamilien belegen diese Entwicklung, da sie aus zwei oder mehreren separaten Domänen zusammengesetzt sind (Babbitt und Gerlt, 2001). Im Falle von *EcoRII* besteht die neu erworbene Funktion in der Abhängigkeit der Enzymaktivität von zwei Kopien der DNA-Erkennungssequenz, ein essentielles Merkmal, das ebenso Enzyme auszeichnet, die in der Zelle an sequenz-spezifischer Rekombination und Transposition beteiligt sind. Die Fähigkeit zur

DNA-Transposition könnte für *EcoRII* einen selektiven Vorteil darstellen. *EcoRII* könnte auf diesem Wege für die horizontale Verbreitung seiner codierenden Gensequenzen, ähnlich einem transponiblen Element, selbst sorgen.

3. Zusammenfassung

Bakterielle R/M-Systeme greifen solche DNA endonukleolytisch an, die nicht die spezifische Markierung der eigenen Wirtszelle trägt, und restringieren auf diese Weise den DNA-Transfer in die Wirtszelle. Es wird allgemein diskutiert, dass die biologische Funktion der R/M-Systeme in der Abwehr von viralen Infektionen besteht. Dieser Funktion entsprechend, erkennen die dimeren TypII-Restriktionsendonukleasen kurze spezifische, unmethylierte Basensequenzen, die sie in Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen an einer definierten Position endonukleolytisch spalten. Die Spaltung des DNA-Doppelstranges erfolgt nach spezifischer DNA-Erkennung und Aktivierung der beiden katalytischen Zentren - eines pro monomerer Enzym-Untereinheit.

Unsere Untersuchungen an der Restriktionsendonuklease *EcoRII* haben erstmals gezeigt, dass Enzyme existieren, die in ihren Eigenschaften von der engen Definition dieser sogenannten orthodoxen TypII-Restriktionsendonukleasen abweichen. Sie brauchen die koordinierte Wechselwirkung mit zwei Kopien ihrer Erkennungssequenz, um katalytisch aktiv sein zu können. Durch den Anspruch, dass DNA-Spaltung nur dann möglich ist, wenn gleichzeitig zwei Erkennungsorte zur Verfügung stehen, erscheint *EcoRII* für die Aufgabe der Abwehr von Virus-Infektionen deutlich weniger geeignet als die orthodoxen TypII-Restriktionsendonukleasen und es entstand die interessante Frage nach anderen zusätzlichen zellulären Funktionen von *EcoRII*. Möglicherweise ist die Abhängigkeit von zwei DNA-Erkennungsorten als eine Art Sicherheitsmechanismus zu betrachten, der die zelluläre DNA beim Vorliegen einzelner unmethylierter Erkennungssequenzen vor suizidaler Restriktion schützt.

Inzwischen haben biochemische und vor allem strukturelle Daten eindrucksvoll belegt, dass die große Gruppe der TypII-Restriktionsendonukleasen weitaus heterogener ist als einmal angenommen. *EcoRII* war das erste Enzym, das nachweislich mit zwei Kopien seiner Erkennungssequenz wechselwirkt. Inzwischen kennt man mehr als zehn Vertreter solcher Enzyme, die jetzt als TypIIE-Restriktionsendonukleasen bezeichnet werden.

Eine monomere *EcoRII*-Untereinheit besteht aus zwei stabilen Proteindomänen - einer C-terminalen katalytisch aktiven Endonuklease-Domäne und einer N-terminalen (zusätzlichen)

DNA-Bindungsdomäne, die beide spezifisch mit der DNA wechselwirken. Die DNA-Bindungsdomänen beider *EcoRII*-Monomere binden zunächst einen der beiden *EcoRII*-Erkennungsorte in der DNA, den Aktivator oder allosterischen Effektor. Diese Bindung geht mit Konformationsänderungen des Proteins einher und aktiviert die beiden Endonuklease-Domänen, den zweiten *EcoRII*-Erkennungsort (Substrat) zu binden und zu spalten. Die beiden nicht identischen Substratbindungsorte im *EcoRII*-Dimer können mit der gleichen DNA-Sequenz wechselwirken. Die aktive Form des Enzyms besteht aus der dimeren *EcoRII*-Restriktionsendonuklease und zwei DNA-Erkennungsorten. Im aktiven Komplex ist der DNA-Erkennungsort, der an die beiden C-terminalen Endonuklease-Domänen von *EcoRII* gebunden ist, das Substrat und wird gespalten.

Die C-terminale Domäne von *EcoRII* (*EcoRII*-C), separat in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, liegt in Lösung als Dimer vor. Die trunkierte Endonuklease spaltet DNA spezifisch und unabhängig von einem zweiten *EcoRII*-Erkennungsort. Die Reaktion verläuft deutlich schneller als die des kompletten *EcoRII*-Proteins. Mit diesen Arbeiten konnten wir erstmals zeigen, daß durch die Verkürzung einer Restriktionsendonuklease deren Spezifität gezielt verändert werden konnte – von 5'CCWGG-(X)_n-CCWGG (*EcoRII*-WT) auf 5'CCWGG (*EcoRII*-C). Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Trunkierung von Restriktionsendonukleasen, die die Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten benötigen, eine generelle experimentelle Strategie sein könnte, um deren katalytische Aktivität zu verbessern.

Da die C-terminale Endonuklease-Domäne von *EcoRII* an sich die DNA spezifisch spalten kann wie eine orthodoxe TypII-Restriktionsendonuklease, stellt sich die Frage nach der Funktion der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne. Denkbar wäre, daß eine „Vorläufer-Endonuklease“ von *EcoRII* im Verlauf der Evolution eine zusätzliche DNA-Bindungsdomäne akquiriert hat. Diese zweite DNA-Bindungsdomäne attenuiert einerseits die endonukleolytische Aktivität der „Vorläufer-Endonuklease“, ermöglicht nun aber andererseits die gleichzeitige Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungsorten.

Die Eigenschaft von *EcoRII* mit zwei Erkennungssequenzen in der DNA gleichzeitig zu interagieren sowie die Identifizierung konservierter funktioneller Aminosäuren in *EcoRII* und der Familie der Integrasen macht eine evolutionäre Verbindung zwischen diesen Enzymen wahrscheinlich. Konservierte Restriktionsendonuklease-ähnliche Strukturen wurden auch in

einer Reihe von Enzymen gefunden, die an Prozessen wie DNA-Transposition, -Rekombination und -Reparatur in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaea beteiligt sind. Die Akquirierung einer zusätzlichen DNA-bindenden Domäne durch *EcoRII* könnte ein Schritt auf dem Weg zu neuen Proteinfunktionen sein. Neben der Spaltung von Phosphodiesterbindungen könnte *EcoRII* dann auch die Verbreitung der *EcoRII*-codierenden DNA-Sequenz in neue Populationen, ähnlich einem transponiblen Element, realisieren.

4. Literaturverzeichnis

4.1 Zitierte eigene Arbeiten (im Text mit Nummern angegeben)

1. KRÜGER, D. H., REUTER, M. (1999) Host-controlled modification and restriction, In: Encyclopedia of Virology, 2nd Edition, (Webster RG, Granoff A, eds). Academic Press, London-New York, 758-763.
2. KRÜGER, D. H., SCHROEDER, C., REUTER, M., BOGDARINA, I. G., BURYANOV, Y. I., BICKLE, T. A. (1985) DNA methylation of bacterial viruses T3 and T7 by different DNA methylases in Escherichia coli K12 cells. Eur. J. Biochem, **150**, 323-330.
3. KRÜGER, D. H., PRÖSCH, S., REUTER, M., GOEBEL, W. (1990) Cloning of the resistant EcoRII recognition site of phage T7 into an EcoRII-sensitive plasmid makes the site susceptible to the restriction enzyme. J. Basic Microbiol, **30**, 679-683.
4. KRÜGER, D. H., BARCAK, G.J., REUTER, M., SMITH, H. O. (1988) EcoRII can be activated to cleave refractory DNA restriction sites. Nucleic Acids Res, **16**, 3997-4008
5. PEIN, C. D., REUTER, M., CECH, D., KRÜGER, D. H. (1989) Oligonucleotide duplexes containing CC(A/T)GG stimulate cleavage of refractory DNA by restriction endonuclease EcoRII. FEBS Lett, **245**, 141-144.
6. PEIN, C. D., REUTER, M., MEISEL, A., CECH, D., KRÜGER, D. H. (1991) Activation of restriction endonuclease EcoRII does not depend on the cleavage of stimulator DNA. Nucleic Acids Res, **19**, 5139-5142
7. REUTER, M., KUPPER, D., PEIN, C. D., PETRUSYTE, M., SIKSNYS, V., FREY, B., KRÜGER, D. H. (1993) Use of specific oligonucleotide duplexes to stimulate cleavage of refractory DNA sites by restriction endonucleases. Anal. Biochem, **209**, 232-237.
8. REUTER, M., PEIN, C. D., BUTKUS, V., KRÜGER, D. H. (1990) An improved method for the detection of Dcm methylation in DNA molecules. Gene, **95**, 161-162.
9. KUPPER, D., REUTER, M., MEISEL, A., KRÜGER, D. H. (1997) Reliable detection of DNA CpG methylation profiles by the isoschizomers MspI / HpaII using oligonucleotide stimulators. BioTechniques, **23**, 843-847.

-
10. KUPPER, D., MÖNCKE-BUCHNER, E., REUTER, M. AND KRÜGER, D. H. (1999) Oligonucleotide stimulators allow complete cleavage of agarose-embedded DNA by particular type II restriction endonucleases. *Anal. Biochem*, **272**, 275-277.
 11. KUPPER, D., REUTER, M., MACKELDANZ, P., MEISEL, A., ALVES, J., SCHROEDER, C., KRÜGER, D. H. (1995) Hyperexpressed EcoRII renatured from inclusion bodies and native enzyme both exhibit essential cooperativity with two DNA sites. *Protein Expr. Purific*, **6**, 1-9.
 12. REUTER, M., KUPPER, D., MEISEL, A., SCHROEDER, C., KRÜGER, D. H. (1998) Cooperative binding properties of restriction endonuclease EcoRII with DNA recognition sites. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8294-8300.
 13. REUTER, M., SCHNEIDER-MERGENER, J., KUPPER, D., MEISEL, A., MACKELDANZ, P., KRÜGER, D. H., SCHROEDER, C. (1999) Regions of endonuclease EcoRII involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. *J. Biol. Chem*, **274**, 5213-5221
 14. MÜCKE, M., LURZ, R., MACKELDANZ, P., BEHLKE, J., KRÜGER, D. H., REUTER, M. (2000) Imaging DNA loops induced by EcoRII: A single amino acid substitution uncouples target recognition from cooperative DNA interaction and cleavage. *J. Biol. Chem*, **275**, 30631-30637
 15. MÜCKE, M., PINGOUD, V., GRELLER, G., BEHLKE, J., KRAFT, R., KRÜGER D. H., REUTER, M. (2002) Asymmetric photo-cross-linking pattern of restriction endonuclease EcoRII to the DNA recognition sequence. *J. Biol. Chem*, **277**, 14288-14293
 16. MÜCKE, M., GRELLER, G., BEHLKE, J., KRAFT, R., KRÜGER, D. H. AND REUTER, M., EcoRII: A restriction enzyme evolving recombination functions? (submitted)
 17. . ZHOU, X., REUTER, M., MEEHAN, E. J. AND CHEN, L. (2002) A new crystal form of restriction endonuclease EcoRII that diffracts to 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D*. (in press)

4.2 Fremdzitate

- ALM, R.A., LING, L.S., MOIR, D.T., KING, B.L., BROWN, E.D., DOIG, P.C., SMITH, D.R., NOONAN, B., GUILD, B.C., DE JONGE, B.L. ET AL. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **397**, 176-180
- ANDO, T., XU, Q., TORRES, M., KUSUGAMI, K., ISRAEL, D.A. AND BLASER, M.J. (2000) Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol. Microbiol.* **37**, 1052-1065
- ARBER, W. AND DUSSOIX, D. (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host-controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **5**, 18-36
- ARBER, W. (1979) Promotion and limitation of genetic exchange. *Science*. **205**, 361-365
- ARBER, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 1-7
- BABBITT, P.C. AND GERLT, J.A. (2001) New functions from old scaffold: How nature reengineers enzymes for new functions. *Adv. Protein Chem.* **55**, 1-28
- BAN, C. AND YANG, W. (1998) Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *EMBO J.* **17**, 1526-1534
- BANNISTER, D. AND GLOVER, S.W. (1968) Restriction and modification of bacteriophage by R+ strains of *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 735-738.
- BART, A., PANNEKOEK, Y., DANKERT, J. AND VAN DER ENDE, A. (2001) NmeSI restriction-modification system identified by representational difference analysis of a hypervirulent *Neisseria meningitidis* strain. *Infect. Immun.* **69**, 1816-1820.
- BATH, A.J., MILSOM, S.E., GORMLEY, N.A. AND HALFORD, S.E. (2002) Many type IIs restriction endonucleases interact with two recognition sites before cleaving DNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 4024-4033
- BERTANI, G. AND WEIGLE, J.J. (1953) Host-controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**, 113-121

-
- BHAGWAT, A.S., JOHNSON, B., WEULE, K. AND ROBERTS, R.J. (1990) Primary sequence of the EcoRII endonuclease and properties of its fusions with beta-galactosidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 767-773
- BICKLE, T.A. AND KRÜGER, D.H. (1993) Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* **57**, 434-450
- BILCOCK, D.T., DANIELS, L.E., BATH, A.J. AND HALFORD, S.E. (1999) Reactions of type II restriction endonucleases with 8-base pair recognition sites. *J. Biol. Chem.* **274**, 36379-36386.
- BITINAITE, J., WAH, D.A., AGGARWAL, A.K. AND SCHILDKRAUT, I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Aca. Sci. U S A.* **95**, 10570-10575
- BITINAITE, J. AND SCHILDKRAUT, I. (2002) Self-generated DNA termini relax the specificity of SgrAI restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1164-1169
- BOYER, H.W., CHOW, L.T., DUGAICZYK, A., HEDGPETH, J. AND GOODMAN, H.M. (1973) DNA substrate site for the EcoRII restriction endonuclease and modification methylase. *Nat. New Biol.* **244**, 40-43.
- BURYANOV, YA.I., BOGDARINA, I.G. AND BAEV, A.A. (1978) Site specificity and chromatographic properties of E. coli K12 and EcoRII DNA-cytosine methylases. *FEBS Lett.* **88**, 251-254.
- CECH, D., PEIN, C-D., KUBAREVA, E.A., GROMOVA, E.S., ORETSKAYA, T.S. AND SHABAROVA, Z.A. (1988) The influence of modifications on the cleavage of oligonucleotide duplexes by EcoRII and MvaI endonucleases. *Nucleosides & Nucleotides.* **7**, 585-588
- CHINEN, A., UCHIYAMA, I. AND KOBAYASHI, I. (2000) Comparison between *Pyrococcus horikoshii* and *Pyrococcus abyssi* genome sequences reveals linkage of restriction-modification genes with large genome polymorphisms. *Gene.* **259**, 109-121
- DAIYASU, H., KOMORI, K., SAKAE, S., ISHINO, Y. AND TOH, H. (2000) Hjc resolvase is a distantly related member of the type II restriction endonuclease family. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4540-4543.

- DEIBERT, M., GRAZULIS, S., SASNAUSKAS, G., SIKSNYS, V. AND HUBER, R. (2000) Structure of the tetrameric restriction endonuclease NgoMIV in complex with cleaved DNA. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 792-799
- DRÖGE, P. (1994) Protein tracking-induced supercoiling of DNA: a tool to regulate DNA transactions in vivo?. *BioEssays.* **16**, 91-99
- FRIEDHOFF, P., LURZ, R., LÜDER, G. AND PINGOUD, A. (2001) Sau3AI, a monomeric type II restriction endonuclease that dimerizes on the DNA and thereby induces DNA loops. *J. Biol. Chem.* **276**, 23581-23588
- GABBARA, S. AND BHAGWAT, A.S. (1992) Interaction of EcoRII endonuclease with DNA substrates containing single recognition sites. *J. Biol. Chem.* **267**, 18623-18630.
- GRAZULIS, S., DEIBERT, M., RIMSELIENE, R., SKIRGAILA, R., SASNAUSKAS, G., LAGUNAVICIUS, A., REPIN, V., URBANKE, C., HUBER, R. AND SIKSNYS, V. (2002) Crystal structure of the Bse634I restriction endonuclease: comparison of two enzymes recognizing the same DNA sequence. *Nucl. Acids Res.* **30**, 876-885.
- GORMLEY, N.A., HILLBERG, A.L. AND HALFORD, S.E. (2002) The type IIs restriction endonuclease BspMI is a tetramer that acts concertedly at two copies of an asymmetric DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **277**, 4034-4041
- HATTMAN, S., GRIBBIN, C. AND HUTCHISON, C.A. (1979) In vivo methylation of bacteriophage phi X174 DANN. *J Virol.* **32**, 845-851
- HICKMAN, A.B., LI, Y., MATHEW, S.V., MAY, E.W., CRAIG, N.L. AND DYDA, F. (2000) Unexpected structural diversity in DNA recombination: The restriction endonuclease connection. *Mol. Cell.* **5**, 1025-1034
- HUAI, Q., COLANDENE, J.D., CHEN, Y., TOPAL, M.D. AND KE, H. (2000) Crystal structure of NaeI _ an evolutionary bridge between DNA endonuclease and topoisomerase. *EMBO J.* **19**, 3110-3118.
- HUAI, Q., COLANDENE, J.D., TOPAL, M.D. AND KE, H. (2001) Structure of NaeI-DNA complex reveals dual-mode DNA recognition and complete dimer rearrangement. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 665-669

- JELTSCH, A., ALVES, J., WOLFES, H., MAASS, G. AND PINGOUD, A. (1994) Pausing of the restriction endonuclease EcoRI during linear diffusion on DANN. *Biochemistry*. **33**, 10215-10219.
- KARPOVA, E.A., MEEHAN, E., PUSEY, M.L., AND CHEN, L. (1999) Crystallization and preliminary X-ray diffraction of restriction endonuclease EcoRII. *Acta Cryst. D*, **D55**, 1604-1605
- KOBAYASHI, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Res. Nucleic Acids*. **29**, 3742-3756
- KONG, H., LIN, L.-F., PORTER, N., STICKEL, S., BYRD, D., POSFAI, J. AND ROBERTS, R.J. (2000) Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucl. Acids Res*. **28**, 3216-3223.
- KOSYKH, V.G., BURYANOV, Y.I. AND BAYEV, A. A. (1980) Molecular cloning of EcoRII endonuclease and methylase genes. *Mol. Gen. Genet*. **178**, 717-718.
- KOSYKH, V.G., PUNTEZHIS, S.A., BURYANOV, Y.I. AND BAYEV, A.A. (1982) Isolation, purification, and characterization of restriction endonuclease EcoRII. *Biokhimiya*. **47**, 619-625.
- KOSYKH, V., REPYK, A., KALIMAN, A. AND BURYANOV Y. (1989) Nucleotide sequence of the EcoRII restriction endonuclease gene. *Biochim. Biophys. Acta*. **1009**, 290-292
- KOVALL, R.A. AND MATTHEWS, B.W. (1998) Structural, functional, and evolutionary relationships between λ -exonuclease and the type II restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 7893-7897
- KRAMER, A., KEITEL, T., WINKLER, K., STÖCKLEIN, W., HÖHNE, W. AND SCHNEIDER-MERGENER, J. (1997) Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*. **91**, 799-809.
- KRÜGER, D.H. AND BICKLE, T.A. (1983) Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev*. **47**, 345-360
- LANIO, T., JELTSCH, A., PINGOUD, A. (2000) On the possibilities and limitations of rational protein design to expand the specificity of restriction enzymes: a case study employing EcoRV as the target. *Protein Eng*. **13**, 275-81

-
- LIN, L.-F., POSFAI, J., ROBERTS, R.J. AND KONG, H. (2001) Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 2740-2745.
- LUKACS, C.M., KUCERA, R., SCHILDKRAUT, I. AND AGGARWAL, A.K. (2000) Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of BglIII and its DNA substrate at 1.5 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 134-140
- MALIN, R., STEINBRECHER, R., JANNSEN, J., SEMMLER, W., NOLL, B., JOHANNSEN, B., FRÖMMEL, C., HÖHNE, W. AND SCHNEIDER-MERGENER, J. (1995) Identification of technetium-99m binding peptides using cellulose-bound combinatorial peptide libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11821-11822
- MEISEL, A., MACKELDANZ, P., BICKLE, T.A., KRÜGER, D.H. AND SCHROEDER, C. (1995) Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. *EMBO J.* **14**, 2958-2966
- MESELSON, M. AND YUAN, R. (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature.* **217**, 1110-1114.
- MORGAN, R., XIAO, J.P. AND XU, S.Y. (1998) Characterization of an extremely thermostable restriction enzyme, PspGI, from a *Pyrococcus* strain and cloning of the PspGI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiology.* **64**, 3669-3673
- MURRAY, N.E. (2002) Immigration control of DNA in bacteria: self versus non-self. *Microbiology.* **148**, 3-20
- NAITO, T., KUSANO, K. AND KOBAYASHI, I. (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science.* **267**, 897-899
- NOBBS, T.J., SZCZELKUN, M.D., WENTZELL, L.M. AND HALFORD, S.E. (1998) DNA excision by SfiI restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* **281**, 419-432
- NUNES-DÜBY, S.E., KWON, H.J., TIRUMALAI, R.S., ELLENBERGER, T. AND LANDY, A. (1998) Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **26**, 391-406

- OLLER, A.R., VANDEN BROEK, W., CONRAD, M. AND TOPAL, M.D. (1991) Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species. *Biochemistry*. **30**, 2543-2549
- PETRAUSKENE, O.V., BABKINA, O.V., TASHLILITSKY, V.N., KAZANKOV, G.M. AND GROMOVA, E.S. (1998) EcoRII endonuclease has two identical DNA-binding sites and cleaves one of two co-ordinated recognition sites in one catalytic event. *FEBS Lett.* **425**, 29-34.
- PETTER, C. (2001) Aufklärung der Struktur und Domänenorganisation der Restriktionsendonuclease EcoRII: Identifizierung von potentiellen Protein-Protein-Kontaktstellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/ Humboldt-Universität Berlin, 2001.
- PINGOUD, A. AND JELTSCH, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3705-3727
- PINGOUD, V., KUBAREVA, E., STENGEL, G., FRIEDHOFF, P., BUJNICKI, J.M., URBANKE, C, SUDINA, A, PINGOUD, A. (2002) Evolutionary relationship between different subgroups of restriction endonucleases. *J. Biol. Chem.* **277**, 14306-14
- REINEKE, U. SABAT R., VOLK, H.-D., AND SCHNEIDER-MERGENER, J. (1998) Mapping of interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. *Protein Sci.* **7**, 951-960
- ROBERTS, R.J. (1998) Bioinformatics: A new world of restriction and modification enzymes. *The NEB Transcript.* **9**, 1-4
- ROBERTS, R. J. AND MACELIS, D. (2001) REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* **29**, 268-269.
- ROCHA, E.P.C., DANCHIN, A. AND VIARI, A. (2001) Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis. *Genome Res.* **11**, 946-958
- RÜDIGER, S., GERMEROOTH, L., SCHNEIDER-MERGENER, J. AND BUKAU, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**, 1501-1507.
- SCHROEDER, C., JURKSCHAT, H., MEISEL, A., REICH, J.G. AND KRÜGER D. H. (1986) Unusual occurrence of EcoP1 and EcoP15 recognition sites and counterselection of

- type II methylation and restriction sequences in bacteriophage T7 DNA. *Gene*. **45**, 77-86
- SIKSNYS, V., SKIRGAILA, R., SASNAUSKAS, G., URBANKE, C., CHERNY, D., GRAZULIS, S. AND HUBER, R. (1999) The Cfr10I restriction enzyme is functional as a tetramer. *J. Mol. Biol.* **291**, 1105-1118.
- SMITH, J.D., ARBER, W. AND KÜHNLEIN, U. (1972) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XIV. The role of nucleotide methylation in in vivo B-specific modification. *J. Mol. Biol.* **63**, 1-8
- SOM, S., BHAGWAT, A.S. AND FRIEDMAN S. (1987) Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the EcoRII modification enzyme. *Nucleic Acids Res.* **15**, 313-332
- STEIN, D.C., GUNN, J.S. AND PIEKAROWICZ, A. (1998) Sequence similarities between the genes encoding the S.NgoI and HaeII restriction/modification systems. *Biol. Chem.* **379**, 575-578
- SZCZELKUN, M.D. AND HALFORD, S.E. (1996) Recombination by resolvase to analyse DNA communications by the SfiI restriction endonuclease. *EMBO J.* **15**, 1460-1469.
- TAMULAITIS, G, SOLONIN, A.S. AND SIKSNYS V. (2002) Alternative arrangements of catalytic residues at the active sites of restriction enzymes. *FEBS Lett.* **518**, 17-22
- TOMB, J.-F, WHITE, O., KERLAVAGE, A.R., CLAYTON, R.A., SUTTON, G.G., FLEISCHMANN, R.D., KETCHUM, K.A., KLENK, H.P., GILL, S., DOUGHERTY, B.A. ET AL. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **388**, 539-547
- TOPAL, M.D. AND CONRAD, M. (1993) Changing endonuclease EcoRII Tyr308 to Phe abolishes cleavage but not recognition: possible homology with the Int-family of recombinases. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2599-2603
- VANAMEE, E., S., SANTAGATA, S. AND AGGARWAL, A.K. (2001) FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J. Mol. Biol.* **309**, 69-78
- VOVIS, G.F., HORIUCHI, K. AND ZINDER, N.D. (1975) Endonuclease R-EcoRII restriction of bacteriophage f1 DNA in vitro: ordering of genes V and VII, location of an RNA promoter for gene VIII. *J Virol.* **16**, 674-684

-
- WAH, D.A., HIRSCH, J.A., DORNER, L.F., SCHILDKRAUT, I. AND AGGARWAL, A.K. (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature*. **388**, 97-100.
- WANG, J.C. AND GIAEVER, G.N. (1988) Action at a distance along a DNA. *Science*. **240**, 300-304.
- WENTZELL, L.M., NOBBS, T.J. AND HALFORD, S.E. (1995) The SfiI restriction endonuclease makes a four-strand DNA break at two copies of its recognition sequence. *J. Mol. Biol.* **248**, 581-595
- XU, Q., MORGAN, R.D., ROBERTS, R.J. AND BLASER, M.J. (2000) Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 9671-9676
- YANG, J., MALIK, H.S. AND EICKBUSH, T.H. (1999) Identification of the endonuclease domain encoded by R2 and other site-specific, non-long terminal repeat retrotransposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 7847-7852.
- YOLOV, A.A., GROMOVA, E.S., KUBAREVA, E.A., POTAPOV, V.K. AND SHABAROVA, Z.A. (1985) Interaction of EcoRII restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. V. Study of single-strand cleavages. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8969-8981
- YOSHIMORI, R., ROULLAND-DUSSOIX, D. AND BOYER, H.W. (1972) R factor-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid: restriction mutants. *J. Bacteriol.* **112**, 1275-1279.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. H. Krüger, der mein Interesse an der Virologie geweckt und meine wissenschaftliche Arbeit seither angeregt, begleitet und unterstützt hat.

Für die konstruktive und kollegiale Zusammenarbeit während der letzten Jahre möchte ich mich bei Frau Dipl.-Chem. Merlind Mücke bedanken. Sie hat durch ihr besonderes Engagement bei der Bearbeitung dieses Themas maßgeblich zur Erstellung meiner Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl.-Biol. Stefanie Reich und Frau Dipl.-Biol. Cordula Petter für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung der vielfältigen Probleme unseres Laboralltags.

Ohne die tatkräftige und qualifizierte Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten durch Frau Petra Mackeldanz, Frau Dipl.-Biol. Elisabeth Möncke-Buchner und Frau Ursula Scherneck hätte die Arbeit nicht gelingen können. Vielen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie, die für ein gutes wissenschaftliches Klima und einen funktionierenden Laborbetrieb sorgen.

Meiner Familie danke ich für ihr Verständnis und für ihre Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten gilt mein Dank der universitären Forschungsförderung der Charité, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Sonnenfeld-Stiftung.