

**Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und  
Aktivität der Dam DNA-Methyltransferase aus  
*Escherichia coli* mit Hilfe von biochemischen und  
biophysikalischen Methoden**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Lilianna Wielitzek  
aus Gleiwitz

Dortmund, im November 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1999 bis November 2002 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Prof. Dr. Elmar Weinhold und Prof. Dr. Axel J. Scheidig in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. R.S. Goody**  
**2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 13.11.2002

---

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungen.....	V
Symbole für Aminosäuren.....	VII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Struktur der DNA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 DNA-Methylierung.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Klassifizierung von DNA-Methyltransferasen (MTasen).....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Die Dam DNA-MTase aus <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Untersuchungen zum Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase         aus <i>E. coli</i>.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 2-Aminopurin als Rezeptorgruppe .....	12
3.1.2 Fluoreszenztitration mit 2-Ap haltigem Duplex-Oligodesoxynukleotid.....	13
<b>3.2 Untersuchungen zur Dimerisierung der Dam DNA-MTase auf der DNA.....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Protein- <i>Crosslinking</i> zur Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen.....	16
3.2.2 Analyse der <i>Crosslinking</i> -Reaktion von Hairpin-DNA mit Dam DNA-MTase unter denaturierenden Bedingungen.....	18
3.2.3 Analyse der <i>Crosslinking</i> -Reaktion von Hairpin-DNA mit Dam DNA-MTase unter nativen Bedingungen.....	20
3.2.4 Aufreinigung und Analyse der <i>Crosslinking</i> -Produkte aus Dam DNA-MTase und Hairpin-DNA.....	23
3.2.5 Analytische Ultrazentrifugation .....	26

---

<b>3.3 DNA-Bindung der Dam DNA-MTase</b> .....	31
3.3.1 Fluoreszenztitrationen mit 2-Ap haltigen Duplex-ODN und der Dam DNA-MTase .....	31
3.3.2 Bindung des Cofaktors AdoMet an die Dam DNA-MTase in Gegenwart von 2-Ap-markiertem Duplex-ODN .....	40
<b>3.4 Transientenkinetik der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase</b> .....	44
3.4.1 Kinetische Untersuchung der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase.....	45
3.4.2 Kinetische Untersuchung der DNA-Bindung von der Dam DNA-MTase in Gegenwart des Cofaktors AdoMet .....	51
<b>3.5 Kristallisation der Dam DNA-MTase</b> .....	54
3.5.1 Datensammlung.....	57
3.5.2 Das Phasenproblem .....	57
<b>3.6 Charakterisierung der DNA-Bindungsstelle der Dam DNA-MTase</b> .....	65
<b>4 DISKUSSION</b> .....	70
<b>4.1 Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase</b> .....	70
<b>4.2 Stöchiometrie des Dam-DNA-Komplexes</b> .....	72
<b>4.3 Bindung der Dam DNA-MTase an DNA</b> .....	74
<b>4.4 Kinetik der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase</b> .....	77
<b>4.5 Kristallisation der Dam DNA-MTase</b> .....	80
<b>4.6 DNA-Bingungstelle der Dam DNA-MTase</b> .....	84
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	87
<b>6 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	89
<b>6.1 Verwendete Materialien</b> .....	89
6.1.1 Chemikalien.....	89
6.1.2 Proteine.....	90
6.1.3 Zellen und Plasmide .....	90
6.1.4 Säulen und Säulenmaterialien .....	90
6.1.5 Puffer .....	91
6.1.6 Medien.....	92
6.1.7 Geräte .....	92

---

<b>6.2</b>	<b>Verwendete ODN</b> .....	94
6.2.1	ODN und ihre Abkürzungen .....	94
<b>6.3</b>	<b>Chromatographische Methoden</b> .....	95
6.3.1	Anionenaustauscher-Chromatographie .....	95
6.3.2	Analytische Gelfiltrations-Chromatographie .....	95
6.3.3	HPLC-Bedingungen .....	96
6.3.4	FPLC-Bedingungen.....	96
<b>6.4</b>	<b>Molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten</b> .....	97
6.4.1	Agarosegelelektrophorese .....	97
6.4.2	Ausplattieren rekombinanter <i>E. coli</i> -Zellen .....	97
6.4.3	Expression der Dam DNA-MTase in <i>E. coli</i> .....	97
6.4.4	Reinigung der Dam DNA-MTase .....	98
6.4.5	Aktivitätstest für die Dam DNA-MTase .....	100
6.4.6	AdoMet-Detektion.....	100
6.4.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit der Methode nach Bradford. ....	100
6.4.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	101
6.4.9	Schägger-Jagow-Polyacrylamidgelelektrophorese (SJ-PAGE).....	101
6.4.10	Coomassie-Färbung .....	101
6.4.11	Hybridisierung von komplementären ODN.....	102
6.4.12	Darstellung der Dam DNA-MTase-Vernetzungs-Produkte .....	102
6.4.13	Analyse der Vernetzungs-Experimente mittels Gelfiltrations- Chromatographie .....	103
6.4.14	Aufreinigung der Vernetzungs-Produkte mittels Anionenaustauscher- Chromatographie .....	103
6.4.15	Proteolytische Fragmentierung des Vernetzungs-Produkts .....	104
6.4.16	Radioaktive DNA-Markierung .....	104
6.4.17	Proteinsequenzierung.....	105
<b>6.5</b>	<b>Biophysikalische Methoden</b> .....	105
6.5.1	Fluoreszenzspektrometrische Methoden .....	105
6.5.2	UV-VIS-Spektroskopie .....	105
6.5.3	<i>Stopped-Flow</i> Messungen .....	106
6.5.4	Analytische Ultrazentrifugation .....	107
6.5.5	MALDI-Massenspektrometrie .....	107

---

<b>6.6 Kristallographische Arbeiten</b> .....	108
6.6.1 Silanisieren der Deckgläser.....	108
6.6.2 Kristallisationsansätze und Kristallisationsbedingungen.....	108
6.6.3 Kristallmontage.....	109
6.6.4 Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten.....	110
<b>7 ANHANG</b> .....	111
<b>7.1 Auswertung der Bindung der Dam DNA-MTase an DNA mit einer     <i>Global-fit</i>-Prozedur</b> .....	111
7.1.1 Gleichungsdatei für die schrittweise Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA.....	111
7.1.2 Gleichungsdatei für die Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA mit vorgelagerter Dimerisierung.....	114
<b>7.2 Gleichungsdatei zur Auswertung von Verdrängungstitrationen</b> .....	116
7.2.1 Gleichungsdatei für kompetitive Titrationen mit der Dam DNA-MTase.....	116
7.2.2 Gleichungsdatei für direkte Verdrängungstitrationen mit der Dam DNA-MTase.....	118
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	120

---

## Abkürzungen

2-Ap	2-Aminopurin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
AETA	5'-[2-(Amino)ethylthio]-5'-desoxyadenosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F <sub>max</sub>	maximale Fluoreszenz
F <sub>min</sub>	minimale Fluoreszenz
G	Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante für Gesamtgleichgewicht
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante für Teilgleichgewicht
k <sub>obs</sub>	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
λ <sub>em</sub>	Emissionswellenlänge
λ <sub>ex</sub>	Excitationswellenlänge
m4C	N4-Methylcytosin
m5C	5-Methylcytosin
m6A	N6-Methyladenin
Mes	2-Morpholinoethansulfonsäure
<i>M·HaeIII</i>	DNA-Methyltransferase aus <i>Haemophilus aegypticus</i>
<i>M·HhaI</i>	DNA-Methyltransferase aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>

---

M- <i>Taq</i> I	DNA-Methyltransferase aus <i>Thermus aquaticus</i>
min	Minute(n)
MME	Monomethylether
MTase	Methyltransferase
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase aus dem T4 Phagen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
quant.	Quantitativ
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SJ-Gel	Schägger und von Jagow-Gel
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
vgl.	vergleiche
XL	Vernetzungsprodukt



---

## Symbole für Aminosäuren

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

# 1 EINLEITUNG

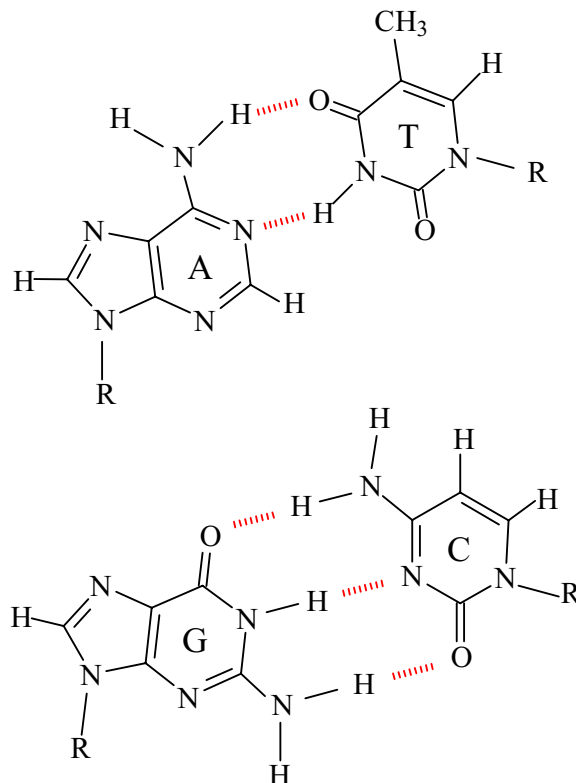
Alle Lebewesen haben einen gemeinsamen Stammbaum und man glaubt, dass sie von einem Organismus abstammen. Am deutlichsten wird dieses gemeinsame Erbe der Evolution am Träger der genetischen Information, die in den Zellen aller Lebewesen in dem gleichen Makromolekül gespeichert ist. Bei diesem Makromolekül handelt es sich um die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die DNA ermöglicht es die genetische Information über einen längeren Zeitraum in jeder Zelle eines Lebewesens zu speichern. Doch kommt es nicht nur darauf an, diesen Informationsgehalt zu speichern, sondern er muß auch an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden. Die DNA besitzt somit zwei wichtige Funktionen. Neben der Speicherung der genetischen Informationen dient sie gleichzeitig als ihre eigene Vorlage bei ihrer Vervielfältigung (Replikation).

## 1.1 Struktur der DNA

Lebewesen weisen einen hohen Grad an Ordnung und Komplexität auf. Zur Aufrechterhaltung und Ausbildung dieser Ordnung ist Information nötig, die in lebenden Systemen in Form von DNA gespeichert ist. Die DNA ist ein lineares Biopolymer, das gewöhnlich aus vier verschiedenen Nukleotiden aufgebaut ist. Diese bestehen jeweils aus einer der vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), die  $\beta$ -glykosidisch am C1'-Atom einer 2'-Desoxyribose-Einheit gebunden sind. Die 2'-Desoxyribose-Reste sind wiederum über 3'-5'-Phosphodiester-Bindungen miteinander verknüpft. Durch die definierte Abfolge (Sequenz) der Basen ist der Informationsgehalt der DNA festgelegt. Die Basen A und T sowie G und C sind jeweils zueinander komplementär und bilden Basenpaare aus, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden. Die Ausbildung von komplementären Basenpaaren über Wasserstoffbrücken ermöglicht die spezifische Dimerisierung von zwei DNA-Ketten zur DNA-Doppelhelix (Watson & Crick, 1953).

Mittlerweile sind mindestens drei Formen der DNA bekannt. Aus Röntgenbeugungsmustern und Röntgenstrukturuntersuchungen kann man ableiten, dass die beiden DNA-Stränge die sogenannte B-Konformation einnehmen, wenn das Gegenion ein Alkalimetall ist und die relative Feuchtigkeit ca. 92 % beträgt. Die sogenannte B-DNA wird als die native Form betrachtet. Die Watson-Crick-Struktur der B-DNA besteht aus zwei Polynukleotidketten, die

sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse winden und eine Doppelhelix mit einem Durchmesser von ca. 2 nm bilden. Die beiden Stränge sind antiparallel orientiert. Die Basen sind im Zentrum der Helix angeordnet, während sich das Zucker-Phosphat Rückgrat der beiden Stränge an der Helixperipherie befindet. Durch diese Anordnung wird die Abstoßung der geladenen Phosphatgruppen minimiert. Die Ebenen der Basenpaare sind annähernd senkrecht zur Längsachse der Helix angeordnet. In Abb. 1 sind die Watson-Crick-Basenpaare dargestellt.



**Abb. 1:** Die Watson-Crick-Basenpaare. Dargestellt sind das A-T-Basenpaar mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen (oben) und das G-C-Basenpaar mit drei Wasserstoffbrückenbindungen (unten).

Eine gedachte Verbindungslinie zwischen den C1'-Atomen ist in den beiden Basenpaaren gleich lang und ergibt gleiche Winkel zu den glykosidischen Bindungen und der Base. Dies verleiht der DNA eine ganze Serie von zweizählig pseudo-symmetrischen Achsen, die durch das Zentrum eines jeden Basenpaares verlaufen und senkrecht zur Helixachse stehen. Die „ideale“ B-DNA hat 10 Basenpaare pro Windung, was einer helikalen Drehung von  $36^\circ$  pro Basenpaar entspricht. Da die aromatischen Basen einen van-der-Waals-Durchmesser von 0,34 nm besitzen und versetzt aufeinandergestapelt sind, hat die Helix eine Ganghöhe, also einen Anstieg pro Windung, von 3,4 nm. Die bemerkenswerteste Eigenschaft der Watson-Crick-Struktur ist, dass sie nur zwei Typen von Basenpaarungen zulässt. Die Geometrie dieser

Watson-Crick-Basenpaare läßt erkennen, dass beide Basenpaare gegeneinander austauschbar sind. Das heißt sie können sich wechselseitig ersetzen, ohne dass dabei die Positionen der C1'-Atome des Zucker-Phosphat-Gerüsts verändert werden. Bei jeder anderen Basenkombination dagegen entstünde eine signifikante Verzerrung der Doppelhelix-Struktur, da die Bildung eines nichtklassischen Watson-Crick-Basenpaares eine erhebliche Reorientierung der Zucker-Phosphat-Kette erfordert. Durch die helikale Form der B-DNA bilden sich an der Außenseite zwei Furchen zwischen den Zucker-Phosphat-Ketten aus. Diese sind von unterschiedlicher Größe, da sich die Oberkante eines jeden Basenpaares von seiner Unterkante unterscheidet und die Desoxyribosereste asymmetrisch sind. In der sogenannten kleinen Furche beträgt der Winkel C1'-Helixachse-C1' innerhalb eines Basenpaares weniger als 180°, während sich die große Furche zur entgegengesetzten Seite eines jeden Basenpaares öffnet. Die Watson-Crick-Struktur läßt jede Basensequenz auf einem der Polynukleotidstränge zu, solange der andere Strang die komplementäre Basensequenz aufweist (Voet, 1994). Die beschriebene Form der DNA-Struktur ist eine Idealform, die allerdings der Struktur von wahrscheinlich 99 % der zellulären DNA nahekommt. Insgesamt ist die DNA kein starres Gebilde sondern weist eine relativ hohe Flexibilität auf. Allgemein nehmen die Basen ihre Positionen unter Ausbildung optimaler hydrophober Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basenpaaren und unter Vermeidung einer sterischen Überlappung funktioneller Seitengruppen in benachbarten Nukleotiden ein.

Bei drastischer Abnahme des Wassergehaltes geht die B-Form der DNA in die starre A-Form über. Dadurch wird die Konformation der Desoxyribose geändert. In beiden DNA-Formen verläuft die Doppelhelix rechtsgängig, doch es bestehen einige strukturelle Unterschiede. In der A-Form stehen die Basenpaare, im Gegensatz zur B-Form, nicht senkrecht zur Zentralachse, sondern sind in einem Winkel von etwas mehr als 20° zu ihr gekippt und von der Helixachse zur großen Furche hin verschoben. Dadurch kommt es zu einem offenen Raum im Innern des Moleküls und zur Ausbildung einer tiefen aber engen großen Furche. In der A-Form liegt das C3'-Atom und in der B-Form das C2'-Atom oberhalb der Ebene, die von den C1'-O4'-C4'-Atomen aufgespannt wird. Es findet ein Übergang von der C2'-endo zur C3'-endo Konformation statt (Saenger, 1984).

Die dritte Form der DNA ist die sogenannte Z-Form. Die Bezeichnung stammt von dem Zick-Zack-Verlauf des Zucker-Phosphodiester-Bandes. Eine andere Bezeichnung ist Links-DNA, weil die Helix im Gegensatz zur B- oder A-Form der DNA, linksgängig verläuft. Zuerst wurde die Z-DNA bei der Untersuchung von DNA-Molekülen mit der Nukleotid-Folge GCGCGCGC in Lösungen mit hohem Salzgehalt gefunden. Unter gewöhnlichen

Lösungsbedingungen können GC-Folgen jedoch auch trotz Torsionsspannungen in der B-Konformation auftreten. Ursache für die Ausbildung der Z-Form ist die Umorientierung der glykosidischen Bindung zwischen der Guaninbase und der Desoxyribose. In der Standard-DNA-Form liegen Zucker und Base in einer anti-Konformation vor. In der Z-Form trifft dies nur für das Cytosin-Nukleotid, aber nicht für das Guanin-Nukleotid zu, das in der ungewöhnlichen syn-Konformation vorliegt. Der Zick-Zack-Verlauf des Zucker-Phosphodiester-Bandes erklärt sich durch das Abwechseln von syn- und anti-Konformation in benachbarten Nukleotiden.

Die klassische B-Form der DNA stellt eine Idealform dar. Die chemischen Bausteine der DNA ermöglichen jedoch eine große Flexibilität. Die Z-Form zeigt eindrücklich, dass die Struktur nicht zuletzt durch die Art und Folge der Nukleotid-Bausteine bestimmt wird. Ob A- oder Z-Form allerdings in der Zelle vorkommen und physiologische Relevanz besitzen, bleibt trotz vieler Untersuchungen ungeklärt.

## 1.2 DNA-Methylierung

Durch chemische Modifikation der Basen kann der Informationsgehalt der DNA zusätzlich erhöht werden. So überträgt der Phage T4 Glukosylgruppen auf 5-Hydroxymethylcytosin und schützt auf diese Weise sein Genom vor dem Abbau durch Wirts-Endonukleasen (Revel, 1983). Die am häufigsten anzutreffende Modifikation des Genoms ist jedoch die Methylierung von Basen innerhalb definierter Sequenzen. So findet man in nahezu allen Lebewesen neben den natürlich vorkommenden Nukleobasen A, C, G und T, auch die methylierten Basen N6-Methyladenin, N4-Methylcytosin und C5-Methylcytosin (Cheng, 1995). Die Methylierung von Nukleobasen wird durch DNA-Methyltransferasen (MTasen) katalysiert. MTasen übertragen die aktivierte Methylgruppe vom Cofaktor S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) auf den N6-Stickstoff von Adenin, den C5-Kohlenstoff von Cytosin oder den N4-Stickstoff von Cytosin innerhalb der spezifischen DNA-Erkennungssequenz (Cheng, 1995). Eine bemerkenswerte, den Mechanismus der Methylierung betreffende Beobachtung, wurde erstmals von Klimasauskas *et al.* (1994) bei der C5-Cytosin DNA MTase aus *Haemophilus haemolyticus* (M·HhaI) gemacht. Danach verläuft die enzymkatalysierte Methylierung des Cytosins über einen DNA-Basenausklapp-Mechanismus, und es wird angenommen, dass alle DNA-MTasen einen ähnlichen Mechanismus zur DNA-Methylierung besitzen. Da eine Nukleotidsequenz methyliert oder nicht-methyliert vorliegen kann, wird ihr

Informationsgehalt durch Methylierung erhöht. Die DNA-Methylierung spielt bei einer Vielfalt von biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. In Prokaryonten dient die Methylierung oft dem Schutz des eigenen Genoms gegen endogene Restriktionsendonukleasen. Desweiteren dient sie der Reparatur von Basenfehlpaarungen, reguliert die Genexpression und die DNA-Replikation. Bei den Eukaryonten hat sie einen Einfluß auf regulatorische Prozesse, wie die Regulation der Genexpression, Zelldifferenzierung während der embryonalen Entwicklung von Säugetieren und die X-Chromosomenverteilung. Im Zusammenhang mit der Genexpression hat die DNA-Methylierung einen Einfluß auf die Krebsentstehung. Man hat in Tumorzellen ein verändertes Methylierungsmuster gefunden. Doch ist bisher ungeklärt, ob es sich dabei um eine Ursache oder eine Folge der Krebsentstehung handelt (Doerfler, 1983; Fujioka, 1992; Gonzalzo und Jones, 1997).

### 1.3 Klassifizierung von DNA-Methyltransferasen (MTasen)

DNA-MTasen können nach der Position, auf die die Methylgruppe übertragen wird, klassifiziert werden. Man unterscheidet somit C-MTasen, die den C5-Kohlenstoff von Cytosin methylieren, und N-MTasen, die den N6-Stickstoff von Adenin bzw. den N4-Stickstoff von Cytosin methylieren (Malone *et al.*, 1995).

Eine andere Einteilung der DNA-MTasen basiert auf der sequenziellen Abfolge von Motiven (Lauster, 1989; Klimasauskas *et al.*, 1989). Man hat in C-MTasen zehn konservierte Motive (I bis X) gefunden, die sich mit weniger konservierten Abschnitten abwechseln. N-MTasen sind dagegen weniger homogen und besitzen nur vier hochkonservierte Motive. Gemeinsam haben alle MTasen die konservierten Motive 1 und 2 (Klimasauskas *et al.*, 1989). Das konservierte Motiv 1 stellt eine Region aus 15 Aminosäuren dar. Es enthält die für N-MTasen wichtige Aminosäuresequenz FxGxG, wobei x für einen beliebigen Aminosäurerest steht. Die umgebenden Aminosäuren sind nicht ganz so hochkonserviert (Timinskas *et al.*, 1995). Das Motiv 2 gehört zu dem am stärksten konservierten Motiv in N-MTasen. Es umfaßt eine Folge von zehn Aminosäureresten an deren Ende das (D, N, S)PPY-Motiv steht. Die Natur des Aminosäurerestes, das dem PPY-Motiv vorausgeht, ist charakteristisch für unterschiedliche Klassen von N-MTasen (Timinskas *et al.*, 1995). Dieses Motiv ist auch für die Basenspezifität der Methylierungsreaktion zuständig, d.h. es tritt in Wechselwirkung mit der zu methylierenden Base (Holz *et al.*, 1999). Beiden konservierten Motiven wird eine Funktion bei der Methylgruppenübertragung und der Cofaktorbindung zugesprochen. Aufgrund der

Funktion von Motiv 1 und 2 müssen beide Motive innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins in räumlicher Nachbarschaft sein, denn nur dann können einzelne Aminosäuren direkt oder indirekt (über AdoMet, DNA, Wasser) in Wechselwirkung miteinander treten. In der Struktur der N6-Adenin DNA MTase aus *Thermus aquaticus* (M·TaqI) (Labahn *et al.*, 1994) und der C5-Cytosin DNA MTase M·HhaI (Cheng, 1994) hat man parallele  $\beta$ -Faltblätter gefunden, an deren Enden jeweils die beiden konservierten Motive liegen. Dadurch können die beiden Motive Wechselwirkungen zueinander ausbilden. Eine weitere Klassifikation der MTasen beruht auf der relativen Position der beiden konservierten Motive innerhalb der MTasen und der Natur des Aminosäurerestes, das dem PPY-Motiv vorausgeht.

Neben diesen hochkonservierten Motiven hat man zwei weitere Motive gefunden, die als Motiv 1s und 3 bezeichnet werden (Timinskas *et al.*, 1995). Das Motiv 1s ist ein Untermotiv von Motiv 1. Es umfaßt 17 Aminosäurereste und ist in nahezu allen N-MTasen zu finden. Der konservierten Komponente PxxL gehen fünf nicht konservierte Aminosäurereste voraus. Wie der Name vermuten läßt, befindet sich dieses Motiv in der Nähe von Motiv 1. Es ist nur 8 - 17 Aminosäurereste davon entfernt.

Das Motiv 3 umfaßt eine Sequenz aus 19 Aminosäureresten. Nach sieben Aminosäureresten findet man die Komponente LxxxG. Dieses Motiv ist wie die anderen Motive auch in nahezu allen MTasen zu finden. Es liegt zwischen 16 und 75 Aminosäurereste von Motiv 2 entfernt (Timinskas *et al.*, 1995).

Die Klassifikation von MTasen kann somit nach der Art des methylierten Atoms (N oder C), nach der Natur des Reaktionsproduktes (m6A, m4C oder m5C) oder nach der Beschaffenheit der Primärstruktur, also nach der Natur des PPY-Motivs oder nach der relativen Position der konservierten Motive 1 und 2 innerhalb der MTase erfolgen (Klimasauskas, 1989).

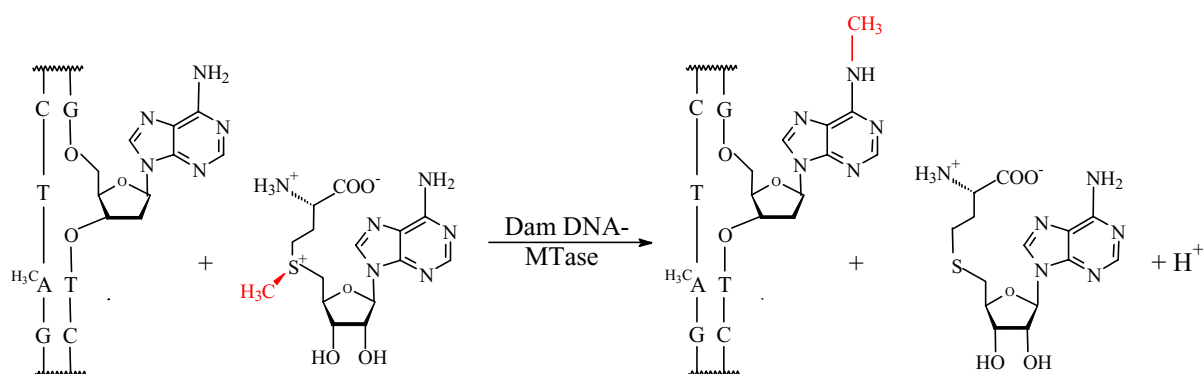
Vergleicht man die zehn in C-MTasen konservierten Motive (I bis X) mit der sequenziellen Abfolge der Aminosäurereste in N-MTasen, so kann man diese durchaus übertragen (Malone *et al.*, 1995). Aufgrund der Abfolge dieser konservierten Motive unterscheidet man drei Gruppen von MTasen, die als  $\alpha$ -Gruppe,  $\beta$ -Gruppe und  $\gamma$ -Gruppe bezeichnet werden (Wilson *et al.*, 1991). Allgemein läßt sich sagen, daß sich die drei Gruppen von MTasen aufgrund der linearen Anordnung dreier Regionen nämlich der AdoMet-Bindungs-Region, der katalytischen Region und der Erkennungs-Region unterscheiden. Die AdoMet-Bindungs-Region setzt sich aus den Motiven I, II, III und X zusammen. Dabei ist das Motiv X im Gegensatz zu den C-MTasen bei den N-MTasen immer dem Motiv I vorgelagert also am N-Terminus des Motivs zu finden. In dieser Region wird der Methioninrest des Cofaktors durch Wechselwirkungen mit einzelnen Aminosäureresten fixiert. Die katalytische Region

setzt sich aus den Motiven IV bis VIII zusammen. Dabei ist das Motiv IV das am höchsten konservierte Motiv. Es enthält die hoch konservierte Abfolge N/DPPY. Diese Abfolge ist Teil einer Schleife, die das aktive Zentrum bildet und sich über die Motive VI bis VIII erstreckt. Die Erkennungs-Region erstreckt sich über einen Teil der Aminosäurekette, die keine konservierten Motive besitzt. Bei den C-MTasen entspricht diese Region der spezifischen DNA Erkennungs-Region.

Die  $\alpha$ -Gruppe, zu der die in dieser Arbeit untersuchte Dam DNA-MTase aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört, hat die folgende Anordnung: AdoMet-Bindungs-Region, Erkennungs-Region und katalytische Region. In der  $\beta$ -Gruppe findet man die Abfolge katalytische Region, Erkennungs-Region, AdoMet-Bindungs-Region und in der  $\gamma$ -Gruppe ist die Reihenfolge AdoMet-Bindungs-Region, katalytische Region und Erkennungs-Region.

## 1.4 Die Dam DNA-MTase aus *Escherichia coli*

Im *E. coli* Bakterium überträgt die Dam DNA-MTase die aktivierte Methylgruppe des Cofaktors S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) auf die exocyclische Aminogruppe des Adenins in hemimethylierter DNA mit der Sequenz 5'-GATC-3' (siehe Schema 1) (Herman und Modrich, 1982). Sie besitzt eine Molmasse von 32 kDa und es wurde bisher angenommen, dass das Enzym als Monomer fungiert (Wenzel *et al.*, 1991).



**Schema 1:** Von der Dam DNA-MTase katalysierte Reaktion.

Bei der Methylierungsreaktion werden S-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy) und ein Proton freigesetzt. Der Cofaktor dient hier zum einen als Methylgruppendonor und möglicherweise als allosterischer Effektor, wodurch die Affinität des Enzyms zur Erkennungssequenz



---

5'-GATC-3' durch Bindung des Cofaktors erhöht wird (Bergerat und Guschlbauer, 1990). Doch ist bislang noch keine Struktur der Dam DNA-MTase bekannt und somit noch kein wirklicher Nachweis für zwei Cofaktorbindungsstellen erbracht worden. Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung kann in drei Schritte unterteilt werden. Spezifische Erkennung der 5'-GATC-3'-Sequenz in Gegenwart des Co-Substrates AdoMet, Methylgruppentransfer und Freisetzung der methylierten DNA und AdoHcy (Bergerat und Guschlbauer, 1990; Bergerat *et al.*, 1991). Desweiteren wirkt der Cofaktor stabilisierend auf die Dam DNA-MTase, die eine hohe Temperaturempfindlichkeit besitzt (Bergerat *et al.*, 1989; Bergerat und Guschlbauer, 1990). Die Methylgruppenübertragung findet zeitlich verzögert nach der DNA-Replikation statt, so dass die DNA zunächst im hemimethylierten Zustand vorliegt (Ogden *et al.*, 1988). Der Methylierungsgrad der DNA innerhalb der Erkennungssequenz (hemi- oder doppelt-methyliert) dient als Signal, das durch viele Systeme in der Zelle erkannt wird. Ein Beispiel hierfür sind post-replikative Reparatur-Systeme (Radman und Wagner, 1986). Zudem hat die Dam DNA-MTase einen Einfluß auf die DNA-Replikation, Transkription von Genen und auf die Segregation von Chromosomen (Messer und Noyer-Weidner, 1988; Barras und Marinus, 1989). Im Gegensatz zu anderen DNA-MTasen ist die Dam DNA-MTase nicht Teil eines Restriktions- und Modifikationssystems sondern alleinständig (Wilson und Murray, 1991; Modrich 1991). Die Dam DNA-MTase gehört aufgrund ihrer konservierten Motive zu der  $\alpha$ -Gruppe der DNA-MTasen. Neben der Dam DNA-MTase aus *E.coli* erkennen und methylieren noch andere Enzyme die 5'-GATC-3'-Sequenz. Zu ihnen gehören z.B. die Dam DNA-MTase aus dem Bakteriophagen T4 (Mac Donald und Mosig, 1984) und die DpnM aus dem DpnII Restriktions-Modifikations-System von *Streptococcus pneumoniae* (Mannarelli *et al.*, 1985).

## 2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die DNA MTasen erhöhen durch Methylierung bestimmter Basen innerhalb spezifischer DNA-Sequenzen den Informationsgehalt der DNA und es stellt sich die Frage nach dem enzymatischen Mechanismus dieser DNA-Modifikation. Durch Bindung von Proteinen an die DNA kann es zu drastischen Konformationsänderungen in der DNA-Struktur kommen. So hat man in der Kristallstruktur der C5-Cytosin DNA MTase M·HhaI im Komplex mit DNA erstmals beobachtet, dass die Zielbase vollständig aus der DNA herausgeklappt wird (Klimasauskas *et al.*, 1994). Dadurch ist die Zielbase gut zugänglich und die Übertragung der Methylgruppe durch das Enzym wird ermöglicht. Dieser Basenausklapp-Mechanismus konnte für eine weitere C5-Cytosin DNA-MTase nämlich für M·HaeIII aus *Haemophilus aegypticus* durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (Reinisch *et al.*, 1995). Durch Bestimmung der Struktur des ternären Komplexes aus M·TaqI, DNA und einem Cofaktoranalogen ist ein solcher Mechanismus auch für eine N6-Adenin DNA MTase nachgewiesen worden (Goedecke *et al.*, 2001). Zuvor wurde aufgrund von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Holz *et al.* (1998) ein Herausklappen der Zielbase durch M·TaqI vermutet. Es stellt sich nun die Frage, ob dieser Basenausklapp-Mechanismus eine allgemeingültige Bedeutung für DNA MTasen hat. Aus diesem Grund soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methylgruppenübertragung der N6-Adenin Dam DNA-MTase aus *E. coli* bezüglich eines möglichen Basenausklapp-Mechanismus untersucht werden. Weiterhin soll die Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert werden und der Einfluß des Cofaktors auf die DNA-Bindung untersucht werden.

Das Wissen um den katalytischen Mechanismus der Dam DNA-MTase könnte ein wichtiges Kriterium für die Synthese neuer Antibiotika sein. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein *Salmonella typhimurium* Bakterienstamm ohne Dam DNA-MTase Aktivität seine Virulenz und somit die Fähigkeit zur Infektion verliert (Heithoff *et al.*, 1999, Garcia-del Portillo *et al.*, 1999). Da die Dam DNA-MTase in vielen pathogenen Bakterienstämmen wie *Yersinia pestis*, *Haemophilus influenzae* und *Treponema pallidum* hoch konserviert ist, könnten spezifische Inhibitoren der Dam DNA-MTase ein breites Anwendungsspektrum als Antibiotikum finden. Für diese Anwendung ist neben dem Wissen über den Reaktionsmechanismus auch das Wissen über die Struktur entscheidend. Deshalb sollen Kristallisationsexperimente als Voraussetzung für eine Strukturbestimmung mit der Dam DNA-MTase durchgeführt werden.

---

Bislang erwiesen sich diese Experimente aufgrund der Instabilität des Enzyms als schwierig, so dass in dieser Arbeit Bedingungen gefunden werden sollen, die es ermöglichen Kristalle der Dam DNA-MTase zu züchten.

Neben der Kristallisation sollen im Rahmen dieser Arbeit Informationen über die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste erhalten werden. Durch eine lichtinduzierte Vernetzungsreaktion mit modifizierter DNA sollen entsprechende Aminosäurereste mit der DNA kovalent verknüpft und durch Edman-Sequenzierung bestimmt werden. Durch die Bestimmung der an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste ist es möglich die DNA-Bindungstasche zu lokalisieren und mit anderen DNA-MTasen zu vergleichen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Untersuchungen zum Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase aus *E. coli*

Die Bindung von Proteinen an DNA führt oft zu drastischen Konformationsänderungen in der DNA-Struktur. Die Proteine können die DNA biegen, aufwinden, schmelzen oder sogar ein Nukleotid aus der DNA-Doppelhelix herausklappen. Ein solches Herausklappen einer Base aus der DNA wurde erstmals in der Kristallstruktur der C5-Cytosin DNA-MTase aus *Haemophilus haemolyticus* (M·HhaI) beobachtet (Klimasauskas *et al.*, 1994). In dieser Struktur wird die DNA nicht gebogen oder in den Furchen aufgeweitet, sondern das Zielcytosin aus der DNA-Doppelhelix herausgedreht und in das aktive Zentrum des Enzyms plaziert. An dieser sequenzspezifischen Wechselwirkung zwischen der DNA-MTase und seinem Substrat sind im wesentlichen zwei Protein-Schleifen beteiligt. Eine Schleife bildet über eine Glutaminseitengruppe spezifische Kontakte zu dem Guaninrest (Roberts, 1995). Eine zweite Erkennungsschleife wechselwirkt hauptsächlich mit dem DNA-Strang, der das Zielcytosin enthält. Das Enzym „umarmt“ mit diesen beiden Schleifen die DNA und stabilisiert das ausgeklappte Cytosin, indem es mit einer der beiden Schleifen in die entstehende Lücke der DNA hineinragt. Durch dieses Ausklappen wird das Zielcytosin im aktiven Zentrum plaziert und für die Katalyse zugänglich gemacht (Cheng, 1995). Ein solcher Basenausklapp-Mechanismus konnte auch für die C5-Cytosin DNA-MTase aus *Haemophilus aegypticus* (M·HaeIII) gefunden werden (Reinisch *et al.*, 1995). Neben diesen C5-Cytosin DNA-MTasen wurde weiterhin für die N6-Adenin DNA-MTase aus *Thermus aquaticus* (M·TaqI) ein solcher Basenausklapp-Mechanismus impliziert (Holz *et al.*, 1998). Es ist gelungen, die ternäre Kristallstruktur von M·TaqI im Komplex mit DNA und dem Cofaktoranalogen AETA zu bestimmen (Goedecke *et al.*, 2001). Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die über eine kurze Schleife miteinander verbunden sind. Diese Domänen spannen eine positiv geladene Furche auf, in der die DNA bindet. Dabei kommt es zu starken Konformationsänderungen der DNA, mit dem Ergebnis, dass das Zieladenin in einer extrahelikalen Position zu finden ist. Die Zielbase wird zusammen mit den benachbarten Phosphatgruppen aus der DNA herausgeklappt. Das ausgeklappte Adenin wird dabei durch spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der Bindungstasche stabilisiert. Neben dem Ausklappen der Base wird die DNA im Bereich der Erkennungssequenz derart verzerrt, dass die DNA in diesem Bereich um ca. 3 Å breiter als gewöhnlich ist, wodurch das

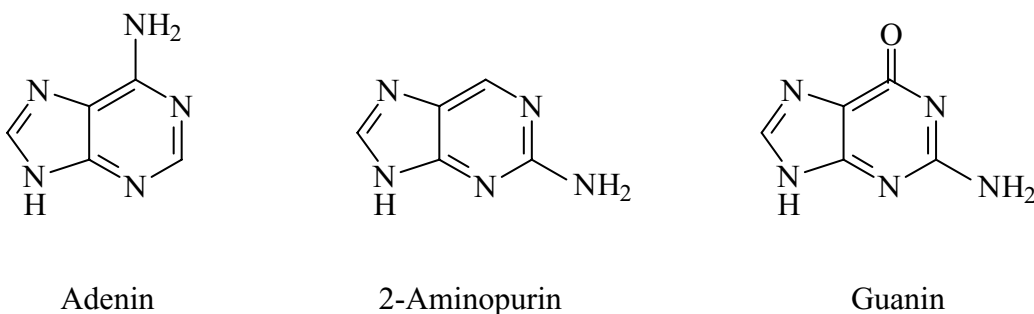
Ausklappen begünstigt wird. Außerdem ist das DNA-Rückgrat an der Position des Partnerthymins durch Wechselwirkungen mit dem Protein um ca. 2 Å senkrecht zur Helixachse komprimiert, wodurch die Partnerbase in Richtung des Zentrums der Doppelhelix verschoben wird.

In dieser Arbeit soll die Dam DNA-MTase im Hinblick auf einen möglichen Basenausklapp-Mechanismus untersucht werden.

### 3.1.1 2-Aminopurin als Rezeptorgruppe

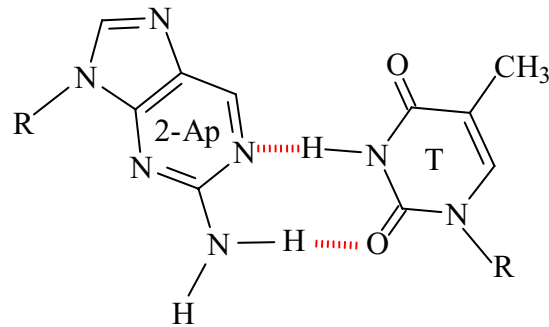
Neben dem direkten Nachweis eines Basenausklapp-Mechanismus mittels Strukturbestimmung kann man durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen Hinweise auf einen solchen Mechanismus erhalten. Dabei wird die jeweilige Zielbase durch einen geeigneten Fluorophor ersetzt. Dieses wurde vor der Bestimmung des ternären Komplexes aus *M·TaqI* mit DNA und AETA bereits erfolgreich mit 2-Aminopurin (2-Ap) als Fluorophor für die N6-Adenin DNA-MTase *M·TaqI* (Holz *et al.*, 1998a) durchgeführt. Weitere DNA-MTasen, die mit 2-Ap an der Zielposition hinsichtlich eines Basenausklapp-Mechanismus untersucht wurden, sind EcoRI (Allan, 1996) sowie die C5-Cytosin DNA-MTase *M·HhaI* (Holz *et al.*, 1998a).

2-Ap eignet sich gut für diese Untersuchungen, da es eine große strukturelle Verwandtschaft sowohl mit Adenin als auch mit Guanin besitzt (vgl. Abbildung 2).



**Abb. 2:** Struktur von Adenin, 2-Aminopurin und Guanin

Desweiteren ist 2-Ap genau wie Adenin in der Lage in doppelsträngiger DNA Wasserstoffbrückenbindungen zu Thymin auszubilden (Sowers *et al.*, 1986, Fagan *et al.*, 1996). In Abb. 3 ist ein 2-Ap:T-Basenpaar dargestellt, dass wie ein A:T-Basenpaar zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.



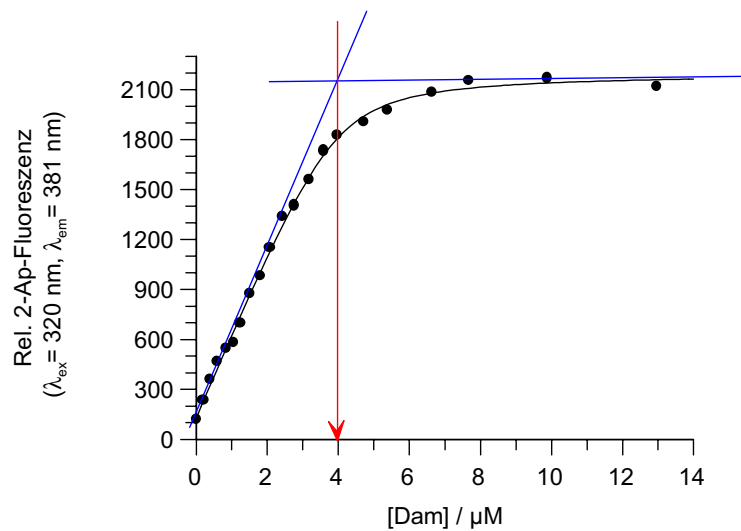
**Abb. 3:** Struktur eines 2-Ap:T-Basenpaares

Untersuchungen zur Stabilität eines 2-Ap:T-Basenpaares, die zum einen auf Schmelztemperaturuntersuchungen (Eritja *et al.*, 1986) und zum anderen auf kalorimetrischen Messungen beruhen (Law *et al.*, 1996), haben gezeigt, dass dieses Basenpaar eine etwas geringere Stabilität als ein A:T-Basenpaar besitzt. Neben diesen strukturellen Eigenschaften sind die fluoreszierenden Eigenschaften von 2-Ap interessant (Ward *et al.*, 1969). 2-Ap kann unter physiologischen Bedingungen selektiv angeregt werden, da die Absorptionsbande im Vergleich zur DNA bei längeren Wellenlängen liegt. Wird 2-Ap in ein Ribocopolymer eingebaut, so wird die Quantenausbeute aufgrund der Basenstapelung um den Faktor 100 reduziert. Durch thermales Denaturieren der helikalen Struktur wird aber ein 3- bis 10-facher Anstieg der Quantenausbeute beobachtet. Mittels Festphasen DNA-Synthese ist ein relativ einfacher Einbau von 2-Ap in DNA möglich (Connolly, 1991), so dass man diese fluoreszierenden Eigenschaften des 2-Ap zur Untersuchung eines möglichen Basenausklapp-Mechanismus nutzen kann.

### 3.1.2 Fluoreszenztitration mit 2-Ap haltigem Duplex-Oligodesoxynukleotid

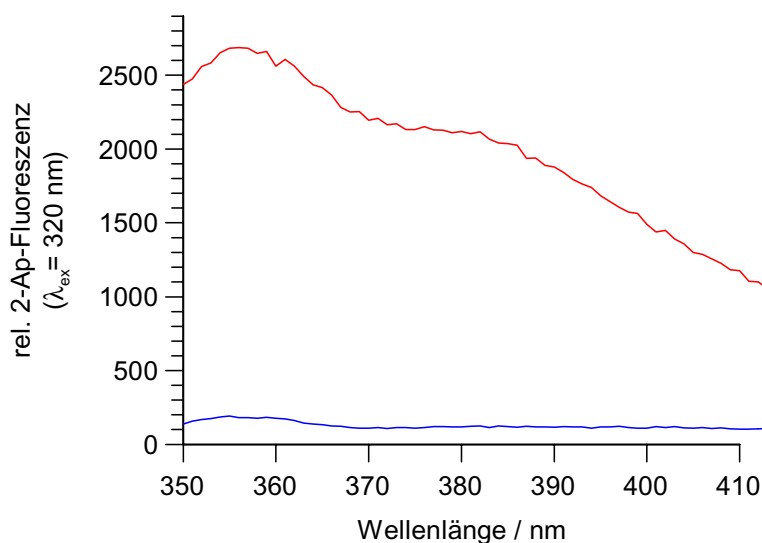
Die Fluoreszenzeigenschaften von 2-Ap sollten zur Untersuchung eines möglichen Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase benutzt werden. Wird das Zieladenin innerhalb der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' gegen 2-Ap ersetzt, so sollte zu Beginn der Titration die Fluoreszenz aufgrund der Basenstapelungswchselwirkungen stark herabgesetzt

sein und im Falle eines Ausklappens der Zielbase beim Binden der Dam DNA-MTase zunehmen. Im ausgeklappten Zustand sollten die Eigenschaften des 2-Ap mehr denen des freien Desoxyribosids entsprechen. Die Titration eines hemimethylierten Duplex-Oligodesoxynukleotids (ODN) mit 2-Ap an der Zielposition (DamP(A2Ap)18h) mit der Dam DNA-MTase ist in Abb. 4 dargestellt. Dabei wurde das Duplex DamP(A2Ap)18h (2  $\mu$ M) vorgelegt und die Dam DNA-MTase sukzessive hinzugefügt.



**Abb. 4:** Fluoreszenztitration von 2  $\mu$ M DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase.

Im Einklang mit den vorhergehenden Überlegungen steigt die Fluoreszenz von 2-Ap im Duplex-ODN DamP(A2Ap)18h bei Wechselwirkung mit der Dam DNA-MTase stark an (vgl. Abb. 5). Insgesamt nimmt die 2-Ap-Fluoreszenz im Protein-DNA-Komplex um das Sechzehnfache zu.



**Abb. 5:** Fluoreszenzemissionsspektrum von DamP(A2Ap)18h (2  $\mu$ M) ohne Enzym (blau) und in Gegenwart von Dam DNA-MTase (13  $\mu$ M, rot).

Dieser Fluoreszenzanstieg verläuft bis zu einer Dam DNA-MTase-Konzentration von ca. 3  $\mu\text{M}$  linear und erreicht eine Sättigung ab einer Dam-DNA-Konzentration von ca. 8  $\mu\text{M}$ . Der Verlauf der Kurve entspricht einer „active-site“-Titration. Dies bedeutet, dass der eigentliche  $K_D$  sehr viel kleiner als 2  $\mu\text{M}$  ist und wahrscheinlich im nano-molaren Bereich liegt. Daher wird am Anfang der Titration die hinzugefügte Dam DNA-MTase beinahe quantitativ gebunden und es resultiert ein linearer Anstieg der 2-Ap-Fluoreszenz. Ab einer bestimmten Konzentration nimmt die 2-Ap-Fluoreszenz nicht mehr zu, da die Bindungskapazität des Duplex-ODN erschöpft ist. Verbindet man nun beide lineare Bereiche miteinander und extrapoliert den Schnittpunkt der beiden Geraden auf die x-Achse, so erhält man eine Bindungsstöchiometrie von 4  $\mu\text{M}$  (vgl. Abb. 4). Dieses Ergebnis ist sehr erstaunlich, denn es bedeutet, dass zwei Dam DNA-MTase Moleküle an ein Molekül Duplex binden, d.h. das Enzym bindet als Dimer und nicht wie bisher angenommen als Monomer an die DNA. Eine alternative Erklärung wäre, dass nur 50 % der Dam DNA-MTase aktiv sind. Da jedoch bei verschiedenen Titrationen und auch bei Titrationen mit Enzym aus älteren Präparationen das gleiche Ergebnis erhalten wurde, erscheint diese Erklärung als wenig wahrscheinlich. Eine weitere Erklärung für die Bindung mit 2:1-Stöchiometrie könnte in einer fehlerhaften Bestimmung der Enzymkonzentration liegen. Bereits in meiner Diplomarbeit (Wilczek, 1999) bin ich dieser Frage nachgegangen. Damals wurde die Dam DNA-MTase Konzentration mittels verschiedener Methoden bestimmt. Die Unterschiede der Enzymkonzentrationen waren aber kleiner, so dass eine deutlich geringere Proteinkonzentration als mögliche Erklärung ausgeschlossen werden konnte.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden zusätzliche Methoden herangezogen, um eine 2:1-Bindungsstöchiometrie zu bestätigen. Die beobachtete sechzehnfache Erhöhung der 2-Ap-Fluoreszenz im Protein-DNA-Komplex deutet außerdem daraufhin, dass auch die Dam DNA-MTase einen Basenausklapp-Mechanismus zur Übertragung der Methylgruppe verwendet.



## 3.2 Untersuchungen zur Dimerisierung der Dam DNA-MTase auf der DNA

### 3.2.1 Protein-Crosslinking zur Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen

Eine häufig verwendete Methode, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden zu untersuchen, ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen beiden Bindungspartnern. Dieses sogenannte *Crosslinking* wird entweder durch bifunktionelle chemische Reagenzien bewirkt oder durch Anregung einer photoreaktiven Gruppe.

Die eingesetzten chemischen Reagenzien, sogenannte bifunktionelle *Crosslinker*, können in drei Gruppen eingeteilt werden: homobifunktionelle und heterobifunktionelle Reagenzien sowie Reagenzien ohne „eigene Länge“. Homobifunktionelle Reagenzien haben zwei identische reaktive Gruppen, die durch einen *Spacer* mit variabler Länge voneinander getrennt sind. Zu ihnen gehören 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol, Glutaraldehyd, *N*-Hydroxysuccinimidester und Imidate. Homobifunktionelle Reagenzien eignen sich z.B. zur Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen mit Quartärstrukturen. Durch die kovalente Verknüpfung wird verhindert, dass der Komplex bei weiterer Analyse in mehrere Polypeptidketten zerfällt. In günstigen Fällen kann man darüberhinaus die vernetzten Aminosäurereste in den beteiligten Polypeptidketten lokalisieren. Dadurch werden wichtige Struktur- und Nachbarschaftsinformationen gewonnen.

Heterobifunktionelle Reagenzien besitzen zwei verschiedene reaktive Gruppen, z.B. eine Maleinimido-Gruppe für die Reaktion mit Thiolgruppen und einen aktivierten Ester für die Reaktion mit Aminogruppen des Proteins.

Ein Beispiel für Reagenzien ohne „eigene Länge“ ist die Bildung von Amidbindungen zwischen Amino- und Carboxygruppen eines Proteins unter Verwendung von Carbodiimiden oder die Bildung von Disulfidbrücken aus zwei Thiolgruppen (Lottspeich, 1998).

Die *Photocrosslinking*-Reaktion, bei der die Ausbildung der kovalenten Bindung nach Anregung mit Licht erfolgt, ist eine gute Methode, um kovalente Komplexe aus Nukleinsäuren und Proteinen herzustellen. Die Identifizierung dieser kovalenten Bindung kann Informationen zu den spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Nukleinsäure liefern. Die eigentliche *Crosslinking*-Reaktion kann zum einen durch Bestrahlung unmodifizierter Nukleinsäure oder zum anderen durch Bestrahlung einer in die Nukleinsäure oder in das Protein eingebrachten photoreaktiven Gruppe erfolgen. Damit sicher

gestellt werden kann, dass es sich bei den beobachteten Kontaktstellen auch tatsächlich um spezifische Wechselwirkungen handelt, sollte die Ausbeute der *Crosslinking*-Reaktion über 10 % betragen. *Photocrosslinking*-Reaktionen mit nicht modifizierten Nukleinsäuren wurden beispielsweise mit DNA und Rinderserumalbumin (Smith, 1964) oder DNA und *E. coli* RNA-Polymerase (Harrison *et al.*, 1982) erfolgreich durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass kein unnatürliches Nukleotid oder Aminosäurerest eingebaut werden muß und somit keine strukturellen Störungen verursacht werden können. Die Ausbeuten liegen allerdings üblicherweise nur zwischen 5 % bis 20 % , so dass man nicht unbedingt davon ausgehen kann, dass es sich um spezifische Wechselwirkungen handelt. Desweiteren wird die Bestrahlung in der Regel mit Wellenlängen kleiner als 300 nm durchgeführt. Dieses hat Photoschädigungen der DNA zur Folge, die eine geringere Ausbeute erklären.

Die am häufigsten als *Photocrosslinking*-Reagenzien verwendeten Chromophore in Nukleinsäuren sind Arylazide, 5-Azidouracil, 8-Azidoadenin, 8-Azidoguanin, 4-Thiouracil, 5-Bromuracil, 5-Ioduracil und 5-Iodcytosin. Diese werden mittels Festphasensynthese in DNA oder RNA eingebaut. In dieser Arbeit wird als synthetisch eingeführter Chromophor 5-Ioduracil verwendet. Da Iod nur geringfügig größer ist als eine Methylgruppe, sollte ein Austausch der Methylgruppe gegen Iod im 5-Ioduracil keine wesentliche strukturelle Veränderung in der DNA verursachen. In analogen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Einzelsubstitution sowohl in DNA als auch in RNA die Bindungskonstante zu Proteinen nicht stört (Willis *et al.*, 1993). Weitere Vorteile liegen darin, dass ein Phosphoramidit von 5-Ioduracil kommerziell erhältlich ist, leicht in ODN eingebaut und mit Wellenlängen größer als 300 nm angeregt werden kann, wodurch eine Photoschädigung des Proteins und der DNA minimiert wird. Der einfachste Mechanismus zur Beschreibung der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen DNA mit 5-Ioduracil und einem Protein geht von einer homolytischen Spaltung der Kohlenstoff-Iod-Bindung unter Bildung eines Uridin-5-ylradikals aus (Rahn, 1992). Untersuchungen mit Tyrosin-Derivaten zeigten eine Adduktbildung wobei die Adduktbildung das Ergebnis der Addition des Radikals an das  $\pi$ -System von Tyrosin und anschließender Abspaltung eines Wasserstoffatoms ist (Norris *et al.*, 1996). Ein weiterer Vorschlag für den Mechanismus geht von  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen dem Pyrimidinrest und dem aromatischen Aminosäurerest aus. Eine solche Anordnung ist ideal für lichtinduzierte Elektronentransferprozesse, die sich ereignen können, wenn eine oxidierbare Aminosäure mit einer halogensubstituierten Pyrimidinbase in Stapelwechselwirkung tritt. Das nach HI-Abspaltung resultierende Radikalanionen-

---

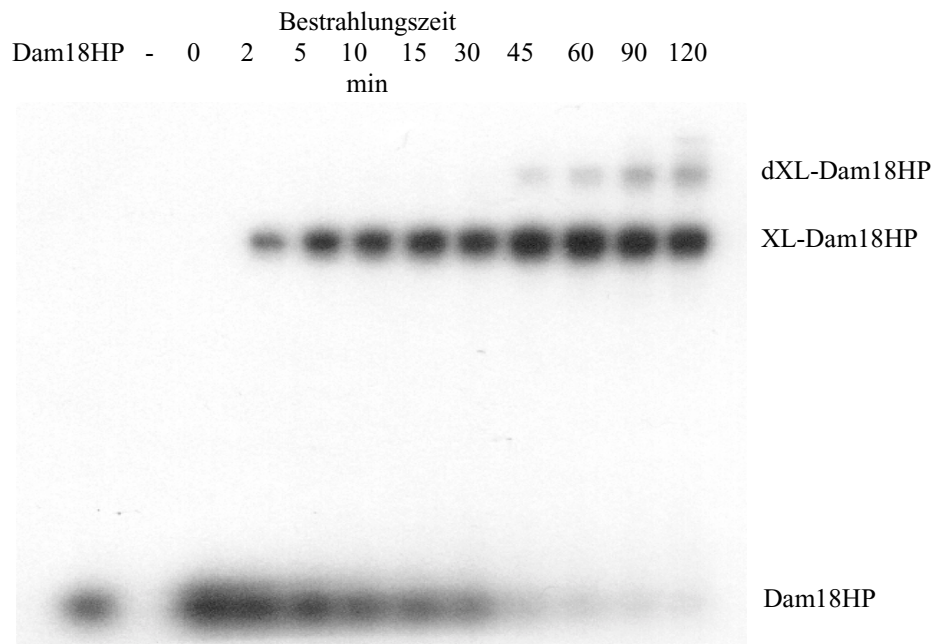
Radikalkationenpaar kann dann durch Rekombination eine kovalente Bindung ausbilden (Meisenheimer *et al.*, 1996; Stump und Hall, 1995).

### **3.2.2 Analyse der *Crosslinking*-Reaktion von Hairpin-DNA mit Dam DNA-MTase unter denaturierenden Bedingungen**

In den Untersuchungen zum Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase hat sich gezeigt, dass scheinbar zwei Dam DNA-MTase Moleküle an die DNA binden. Nun gilt es, diese Beobachtung zu bestätigen bzw. zu verifizieren. Für weitere Untersuchungen zu diesem Thema wird die *Photocrosslinking*-Reaktion mit 5-Ioduracil als Chromophor in DNA herangezogen.

Bereits in früheren Arbeiten wurde diese Methode angewandt, um kovalente Komplexe zwischen DNA und der *EcoRI* DNA-MTase (Wong *et al.*, 1998) und den DNA-MTasen *M·TaqI* und *M·CviBIII* (Holz *et al.*, 1999a) darzustellen. Da im Falle der Dam DNA-MTase jedoch zwei Proteinmoleküle an die DNA binden sollten, muss eine Doppelsubstitution innerhalb der Erkennungssequenz durchgeführt werden. In beiden DNA Strängen wird das Zieladenin gegen 5-Ioduracil ersetzt. Für die *Crosslinking*-Reaktion wird jedoch keine doppelsträngige DNA verwendet, sondern eine Hairpin-DNA eingesetzt. Dies ist notwendig, da man andernfalls jeweils einen Komplex aus einzelsträngiger DNA und der Dam DNA-MTase erhalten würde. Damit es zu keinen Wechselwirkungen zwischen der Schleife und der Dam DNA-MTase kommt, wird ein Hexaethylenlinker eingesetzt, der eine Rückfaltung der DNA ermöglicht.

Wird das Hairpin-ODN Dam18HP (2  $\mu\text{M}$ ), das anstelle von den beiden Zieladeninen jeweils 5-Ioduracil enthält, in Anwesenheit von Dam DNA-MTase und AdoMet (100  $\mu\text{M}$ ) mit einer Hg-Dampflampe bestrahlt, so bilden sich zwei *Photocrosslink*-Produkte. Diese besitzen unter denaturierenden Bedingungen eine geringere Mobilität als die Hairpin-DNA alleine.



**Abb. 6:** Autoradiodiagramm (DNA-Detektion) des zeitlichen Reaktionsverlaufs der Bestrahlung von 2 µM Dam18HP mit Dam DNA-MTase in Gegenwart von 100 µM AdoMet.

In Abb. 6 ist der zeitliche Reaktionsverlauf unter Benutzung des radioaktiv markierten Hairpin-ODN Dam18HP gezeigt. Um die Lebensdauer und somit auch die Ausbeute an den beiden *Crosslinking*-Produkten zu erhöhen, wird zu Beginn der Bestrahlung eine 4 µM Dam DNA-MTase Lösung vorgelegt. Nach 30, 60 und 90 min wird jeweils weitere Dam DNA-MTase Lösung zugegeben, so dass nach 30 min ein vierfacher Überschuss, nach 60 min ein sechsfacher und nach 90 min ein achtfacher Überschuss an Dam DNA-MTase in bezug auf das Hairpin-ODN vorliegt.

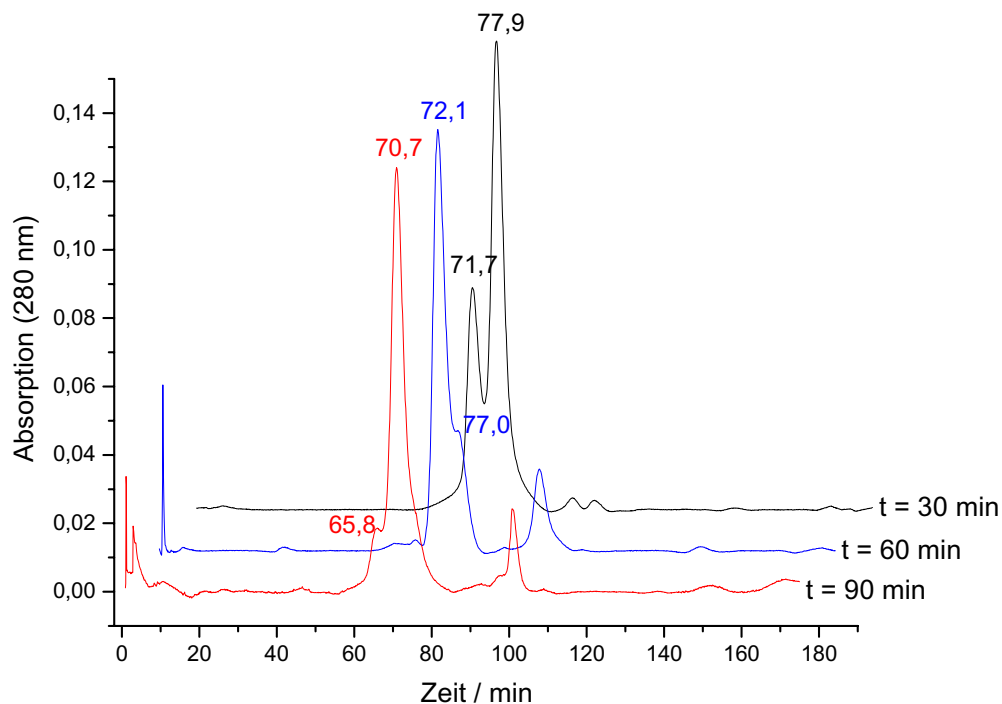
In dem Autoradiodiagramm erkennt man, dass bereits nach 2 min ein erster Komplex aus Dam DNA-MTase und Hairpin-ODN (XL-Dam18HP) gebildet wird. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer und auch zunehmendem Dam DNA-MTase Überschuss nimmt die Ausbeute zu und es wird nach 45 min eine nahezu quantitative Umsetzung der Hairpin-DNA erreicht. Nach 45 min Bestrahlung erkennt man neben dem ersten *Crosslinking*-Produkt ein weiteres Produkt (dXL-Dam18HP), dessen Mobilität unter denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese kleiner ist als die des ersten Produktes. Dieses deutet darauf hin, dass ein möglicher 2:1-Komplex aus zwei Molekülen Dam DNA-MTase und einem Molekül Hairpin-DNA gebildet wurde. Die geringe Ausbeute an 2:1-Komplex, die nach etwa 90 min ihren Maximalwert erreicht, lässt sich damit erklären, dass bereits in den ersten 90 min

nahezu alle Kohlenstoff-Iod-Bindungen photolytisch gespalten wurden, die entweder mit der Dam DNA-MTase oder aber mit einem benachbarten Wassermolekül reagiert haben. Da sich laut des Autoradiodiagramms aber bevorzugt erst der 1:1-Komplex bildet, steht für die Bildung des zweiten Komplexes nur noch eine geringe Menge an nicht abreagierten Uridin-5-ylradikalen zu Verfügung.

In diesem *Crosslinking*-Experiment hat sich ein zweiter Komplex gebildet bei dem es sich möglicherweise um einen 2:1-Komplex aus Dam DNA-MTase und Hairpin-ODN handelt. Da jedoch die Ausbeute an diesem Produkt sehr gering ist, bedarf es noch weiterer Untersuchungen des *Crosslinking*-Produktes.

### **3.2.3 Analyse der *Crosslinking*-Reaktion von Hairpin-DNA mit Dam DNA-MTase unter nativen Bedingungen**

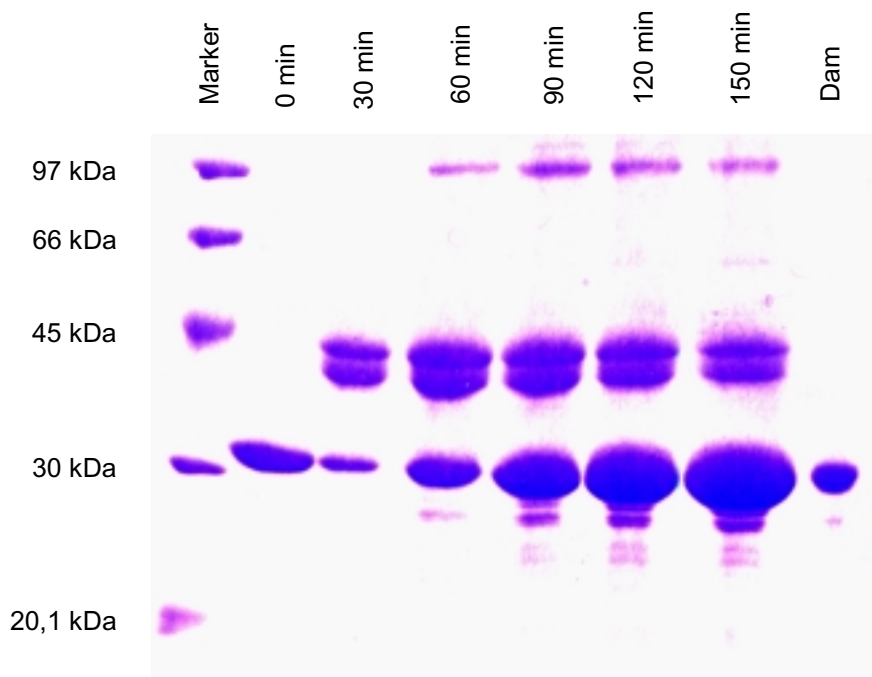
Nachdem unter denaturierenden Bedingungen im Schägger-Jagow-Gel zwei Produkte mit einer geringeren Mobilität als die Hairpin-DNA zu sehen sind, stellt sich die Frage, wie das Laufverhalten des Produktes der Bestrahlungsreaktion unter nativen gelelektrophoretischen Bedingungen aussieht. Um nahezu native Bedingungen zu erhalten, wird der Reaktionsfortschritt der *Crosslinking*-Reaktion mittels Gelfiltrations-Chromatographie verfolgt. Erneut wird das Hairpin-ODN (Dam18HP, 25  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von Dam DNA-MTase und AdoMet (100  $\mu\text{M}$ ) mit einer Hg-Dampflampe bestrahlt. Nach jeweils 30 minütiger Bestrahlung wird eine Probe entnommen, mittels Gelfiltrations-Chromatographie die Produktzusammensetzung und damit der Reaktionsfortschritt analysiert und für die weitere Bestrahlung erneut Dam DNA-MTase zugegeben. Zu Beginn der Bestrahlung wird ein äquimolares Verhältnis an Dam DNA-MTase in bezug auf die Hairpin-DNA vorgelegt. Durch weitere Zugaben an Dam DNA-MTase in 30 minütigen Abständen (jeweils zwei Dam-Äquivalente), wird das Verhältnis auf einen 9fachen Überschuß der Dam DNA-MTase nach 120 Minuten erhöht. In Abb. 7 sind die Chromatogramme nach verschiedenen Bestrahlungszeiten dargestellt.



**Abb. 7:** Gelfiltrationsanalyse der Bestrahlung von 25  $\mu\text{M}$  Dam18HP mit Dam DNA-MTase in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  AdoMet (Verhältnis Hairpin-ODN zu Dam DNA-MTase: 30 min 1:1, 60 min 1:3, 90 min 1:5).

Betrachtet man das Chromatogramm nach 30 minütiger Bestrahlung, so erkennt man ein Hauptsignal bei 77,9 min, bei dem es sich um die Hairpin-DNA handelt. Die Dam DNA-MTase ist im Chromatogramm nicht zu erkennen, da sie sehr instabil ist und bereits auf dem dem Säulenmaterial vorgelagerten Filter ausfällt. Ein weiteres Signal bei 71,7 min zeigt bei 30 minütiger Bestrahlung eine geringere Absorption bei 280 nm, die jedoch nach 60 min Bestrahlung zunimmt und zum Hauptsignal wird. Auch nach 90 min Bestrahlung findet man dieses Signal bei 70,7 min, welches dem Komplex aus einem Molekül Dam DNA-MTase und einem Molekül Hairpin-DNA zugeordnet wird. Neben diesem Produkt erkennt man nach 90 minütiger Bestrahlung bei 65,8 min ein weiteres Produkt. Dieses neue Produkt wird dem Komplex aus zwei Molekülen Dam DNA-MTase und einem Molekül Hairpin-DNA zugeordnet.

Parallel zu den Gelfiltrationsläufen wurde der Reaktionsverlauf durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Das Gel ist in Abb. 8 dargestellt.

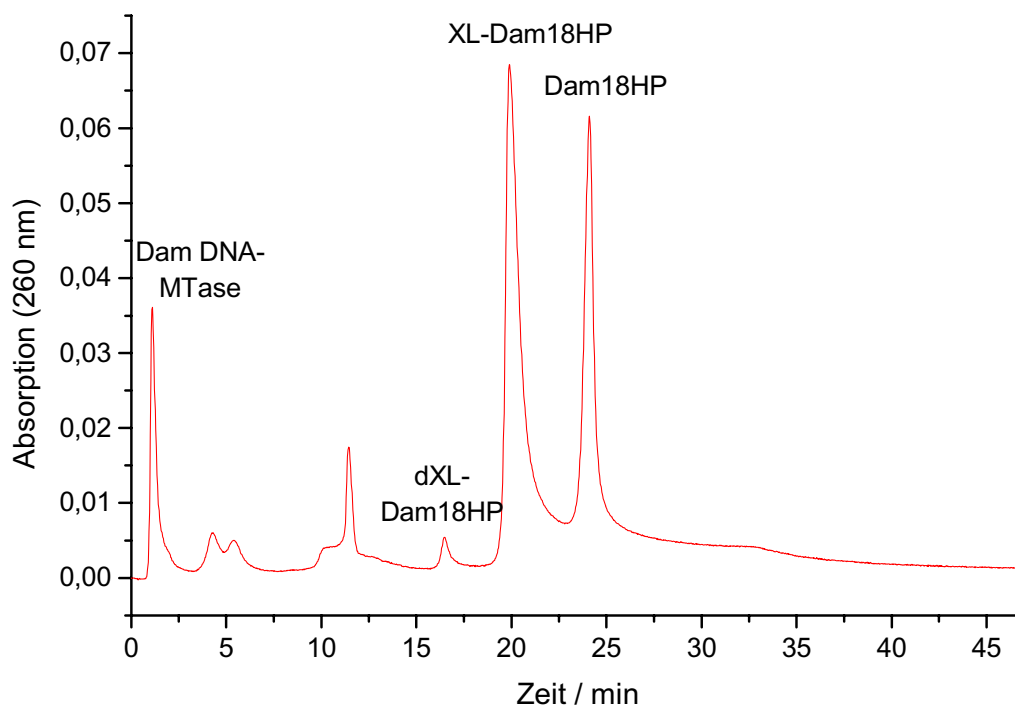


**Abb. 8:** Denaturierende PAGE (Protein-Detektion) der *Crosslinking*-Reaktion von Hairpin-ODN (25  $\mu$ M) mit Dam DNA-MTase in Gegenwart von AdoMet (100  $\mu$ M).

Bei Betrachtung des entsprechenden SDS-Gels wird diese Zuordnung der Signale bestätigt. Nach 30 min Bestrahlung findet man neben der Dam DNA-MTase Bande eine Doppelbande mit geringerer Mobilität. Diese hat ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 45 kDa. Für den XL-Dam18HP Komplex wird eine Masse von 44 kDa erwartet. Dass dieser Komplex als Doppelbande im denaturierenden Gel erscheint, liegt vermutlich an der bei der *Crosslinking*-Reaktion eingesetzten Hairpin-DNA begründet. Es handelt sich um eine nicht palindromische Sequenz, die je nachdem an welcher Seite die erste Dam DNA-MTase kovalent gebunden wird, ein unterschiedliches Laufverhalten in einem denaturierenden Gel hat. Da der Dam DNA-MTase keine Position an der sie zuerst binden soll, vorgegeben wird, liegt die Wahrscheinlichkeit bei 50 % das sie an eine der beiden Seiten bindet. Deshalb sind beide Banden der Doppelbande in ihrer Intensität gleich stark. Nach 90 min Bestrahlung erkennt man deutlich den 2:1-Komplex (dXL-Dam18HP), der im SDS PAGE eine noch geringere Mobilität als der 1:1-Komplex (XL-Dam18HP) hat. Die zugeordnete Masse von 97 kDa ist höher als die erwartete Masse von 76 kDa. Eine Erklärung hierfür wäre, dass es sich nicht mehr um einen globulären Komplex handelt und dieser infolgedessen auch ein anderes Laufverhalten hat als die eingesetzten Markerproteine.

### 3.2.4 Aufreinigung und Analyse der *Crosslinking*-Produkte aus Dam DNA-MTase und Hairpin-DNA

Bislang ist gezeigt worden, dass bei der Bestrahlung von Hairpin-DNA in Gegenwart von Dam DNA-MTase zwei Produkte entstehen. Es deutet einiges darauf hin, dass es sich bei den Produkten zum einen um einen 1:1-Komplex und zum anderen um einen 2:1-Komplex handelt. Um diesen 2:1-Komplex genauer zu untersuchen, muß er von den Edukten und weiteren Produkten getrennt werden. Die Reinigung erfolgt mittels Anionenaustauscher-Chromatographie. Zunächst wird eine Lösung aus Hairpin-DNA (40  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von Dam DNA-MTase (400  $\mu\text{M}$ ) und AdoMet (100  $\mu\text{M}$ ) mit einer Hg-Dampfampe bestrahlt. Nach 75 min Bestrahlung wird die Reaktion beendet, denn mit zunehmender Bestrahlungszeit nimmt die Photoschädigung zu und infolge dessen sinkt die Ausbeute. Anschließend wird der 2:1-Komplex durch Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 9 dargestellt.

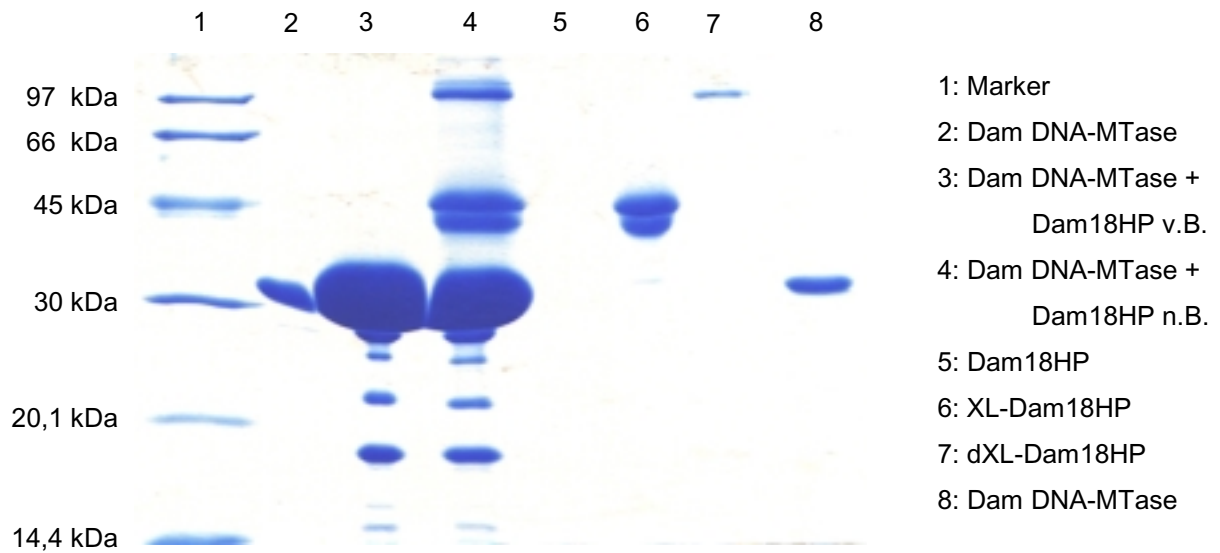


**Abb. 9:** Anionenaustauscher-Chromatogramm der Aufreinigung von dXL-Dam18HP.

Da die negative Ladung der Hairpin-DNA durch die kovalent gebundene Dam DNA-MTase zunehmend stärker abgeschirmt wird, eluiert dXL-Dam18HP (16,5 min) bei geringerer Salzkonzentration als XL-Dam18HP (19,9 min) und als die Hairpin-DNA (24,1 min). Die



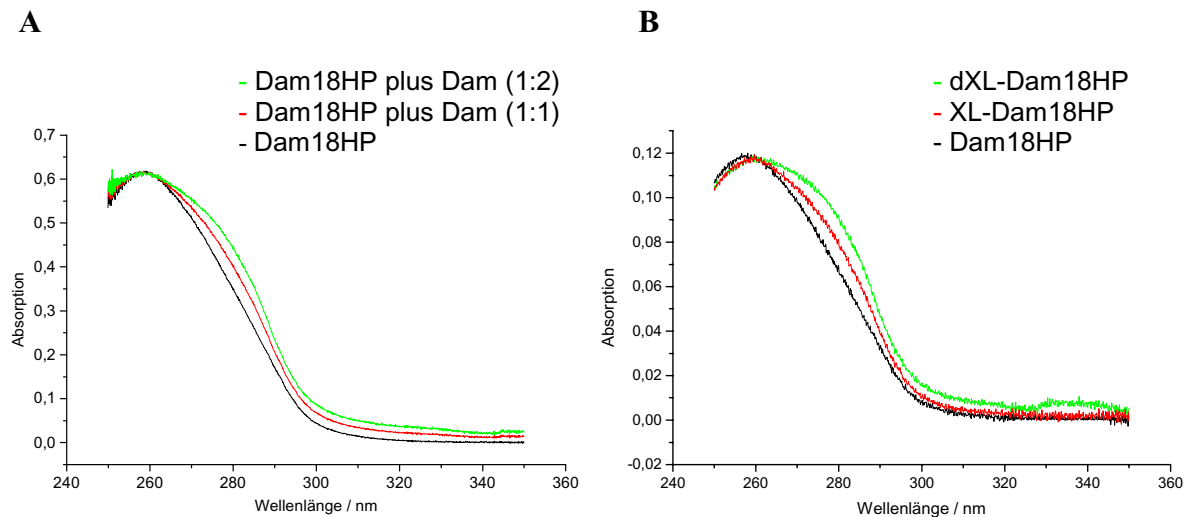
durch Anionenaustauscher-Chromatographie isolierten Produkte wurden von Salz befreit und gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abb. 10). Um sicher zu stellen, dass es sich bei den Komplexen um kovalent verknüpfte Produkte handelt, wird als Vergleich eine Probe vor der Bestrahlung aufgetragen.



**Abb. 10:** SDS PAGE von gereinigtem XL-Dam18HP, dXL-Dam18HP und nicht gereinigtem *Crosslinking*-Ansatz (v.B. = vor Bestrahlung, n.B. = nach Bestrahlung).

Das SDS-Gel zeigt, dass die mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigten Produkte tatsächlich auch die Komplexe sind, die eine geringere Mobilität im Gel besitzen als die Dam DNA-MTase.

Von den beiden gereinigten Komplexen wurden UV-Spektren gemessen und mit überlagerten Spektren verglichen. Die Spektren sind in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11:** A. UV-Spektrum von Dam18HP, Überlagerung vom Dam18HP und Dam (1:1-Stöchiometrie) und Überlagerung von Dam18HP und Dam (1:2-Stöchiometrie).  
B. UV-Spektren von Dam18HP, XL-Dam18HP und dXL-Dam18HP.

Die überlagerten Spektren werden durch Addition des UV-Spektrums von Dam18HP und der Dam DNA-MTase (1:1-Stöchiometrie) bzw. mit dem mit dem Faktor zwei multiplizierte Dam DNA-MTase Spektrum erhalten. Wie bei dem überlagerten Spektrum vorausgesagt, nimmt die Absorption bei 280 nm relativ zu 260 nm im XL-Dam18HP-Spektrum zu und wird im dXL-Dam18HP-Spektrum noch übertroffen (siehe Tab. 1).

**Tab. 1.** Vergleich der überlagerten mit den gemessenen Absorptionsverhältnissen bei 260 nm und 280 nm.

260 nm / 280 nm	Dam18HP	XL-Dam18HP	dXL-Dam18HP
Überlagerte Spektren	1.72	1.49	1.35
Gemessene Spektren	1.72	1.47	1.30

Das UV-Verhältnis (260 nm / 280 nm) sollte aufgrund der zusätzlichen Absorption durch das Protein im XL-Dam18HP Komplex gegenüber dem Dam18HP kleiner werden. Noch kleiner sollte es im dXL-Dam18HP werden. Dieser durch die überlagerten Spektren vorausgesagte Trend wird in den gemessenen UV-Spektren bestätigt und das Verhältnis nimmt von 1,72 im Dam18HP über 1,47 im XL-Dam18HP bis zu 1,30 im dXL-Dam18HP stetig ab. Somit ist eindeutig gezeigt, dass der Proteingehalt stetig zunimmt.

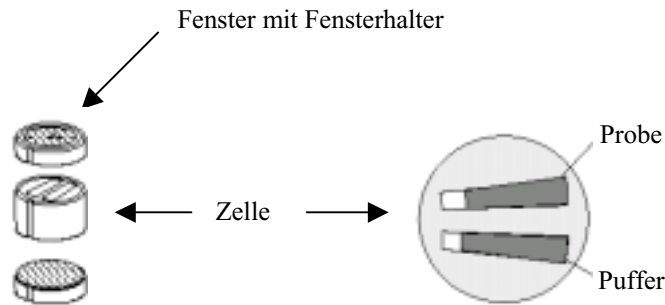
Weiterhin wird dXL-Dam18HP massenspektrometrisch untersucht, um einen letzten Nachweis für die Existenz eines 2:1-Komplexes aus Dam DNA-MTase und Dam18HP zu erhalten. Für den Komplex wird eine Masse von 75868 Da bestimmt. Die berechnete Masse beträgt 76311 Da und weicht damit um nur 0,6 % vom theoretisch berechneten Wert ab.

Mit Hilfe der *Crosslinking*-Reaktion ist es somit gelungen, die Ergebnisse aus den Fluoreszenz-Titrationsen zu bestätigen und einen kovalenten Komplex aus zwei Molekülen Dam DNA-MTase und einem Molekül Hairpin-DNA herzustellen. In natürlichen Systemen findet jedoch keine kovalente Verknüpfung zwischen dem Enzym und der DNA statt und es bleibt somit die Frage offen, ob es wirklich zur Ausbildung eines stabilen nicht-kovalenten 2:1-Komplexes kommt.

### 3.2.5 Analytische Ultrazentrifugation

Mittels analytischer Ultrazentrifugation wird die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von biologischen oder synthetischen Makromolekülen in Lösung untersucht. Die Methode hat wesentliche Beiträge zu den Kenntnissen über Biomakromoleküle geliefert. So sind mit dieser Methode die Bestimmung der Molekulargewichte vieler Proteine, Nukleinsäuren und supramolekularer Aggregate gelungen. Die Entwicklung der Computertechnik machte es möglich mittels analytischer Ultrazentrifugation komplexe Assoziationen zwischen Makromolekülen zu untersuchen. Die Besonderheit dieser Methode ist, dass sie im Gegensatz zu praktisch allen anderen Techniken, auch die Analyse kurzlebiger Komplexe erlaubt. Damit werden Untersuchungen von Assoziationsgleichgewichten möglich. Typische Fragestellungen betreffen die Art der Selbstassoziation eines Proteins, die Stöchiometrie eines Protein-Protein-Komplexes aus zwei verschiedenen Untereinheiten oder die Stöchiometrie von Protein-Nukleinsäure-Komplexen.

Eine analytische Ultrazentrifuge ist eine Kombination aus einer Zentrifuge und einem Spektralphotometer bzw. einem Diffraktometer. Die Zentrifugenröhrchen sind gleichzeitig die Küvetten für die optische Messung. Die Zellen einer analytischen Ultrazentrifuge sind sektorenförmig und radial im Rotor angeordnet (siehe Abb. 12), so dass jegliche Wanderung von Teilchen gegen eine seitliche Zellwand vermieden wird. Üblicherweise werden die Zellen zu Beginn des Experiments homogen mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt. Grundsätzlich kann man analytische Ultrazentrifugationen nach Gleichgewichts- und Nicht-Gleichgewichtsexperimenten einteilen (Byron, 1996).



**Abb. 12:** Sektorförmige Zellen einer analytischen Ultrazentrifuge. Die Zellen werden mit dicken Quarzglasplatten abgeschlossen und stellen so eine Absorptionsküvette dar. Zur besseren Übersicht sind der Zellen- und die Fensterhalter weggelassen.

Die Bestimmung eines Sedimentationskoeffizienten ist ein Nicht-Gleichgewichtsexperiment. Dabei wird eine anfänglich homogene Lösung bei hohen Drehzahlen zentrifugiert und es bildet sich mit der Zeit eine Grenzschicht zwischen der Lösung der sedimentierenden Partikel und dem Lösungsmittel aus. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht kann der Sedimentationskoeffizient der Teilchen ermittelt werden nach

$$\frac{d \ln \bar{x}}{dt} = s \omega^2$$

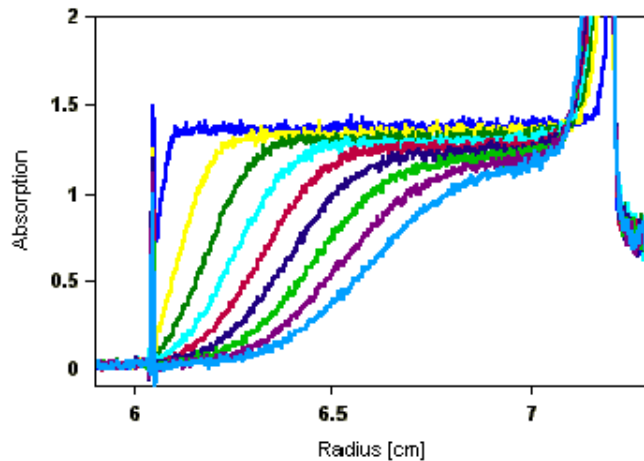
mit

$\bar{x}$  = Entfernung der wandernden Grenzschicht vom Rotormittelpunkt

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors

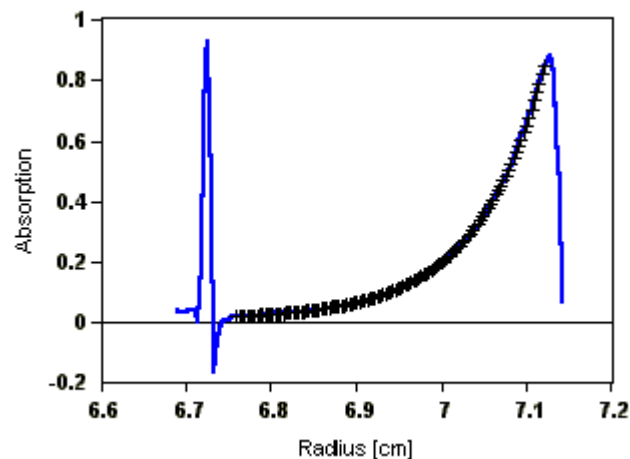
$s$  = Sedimentationskoeffizient des Teilchens.

Bei der Bestimmung der Position der wandernden Grenzschicht treten jedoch häufig Probleme auf. Selbst bei einer einheitlich sedimentierenden Substanz wird die Grenzschicht durch Diffusion verbreitert und damit die Bestimmung der Position erschwert sein. In guter Näherung gilt jedoch, dass der Wendepunkt einer Auftragung der Konzentration gegen die Entfernung vom Rotormittelpunkt die Position der Grenzschicht wiedergibt (vgl. Abb. 13).



**Abb. 13:** Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge (Nicht-Gleichgewichtsexperiment). Die Grenzschicht in der anfänglich homogen gefüllten Zelle wandert von links nach rechts. Wegen der Diffusion verbreitert sie sich dabei. Aufgrund der Sektorform der Zelle und der mit der Entfernung vom Rotormittelpunkt zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen nimmt die Konzentration im Plateaubereich während der Zentrifugation ab.

Bei der Gleichgewichtszentrifugation kommt es nicht mehr auf die Beobachtung der Wanderung der Teilchen im Schwerfeld an. Vielmehr wird bei relativ geringen Drehzahlen so lange zentrifugiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Sedimentation der Teilchen zum Boden und ihrer Diffusion zum Meniskus hin einstellt (vgl. Abb. 14).



**Abb. 14:** Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation. Das Signal links stellt den Meniskus der Lösung und der steile Absorptionsabfall rechts den Boden des Zentrifugenröhrchens dar. Aus dem gleichmäßigen Anstieg der Absorption bzw. Konzentration zwischen Meniskus und Boden bei gegebener Winkelgeschwindigkeit des Rotors kann die Molmasse bestimmt werden.

Der Konzentrationsgradient, der sich in einem solchen Gleichgewicht einstellt, ist ein Maß für die Molmasse der sedimentierenden Teilchen:

$$\frac{\partial \ln c(x)}{\partial x^2} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{2RT} \omega^2$$

mit

$c(x)$  = Konzentration am Ort  $x$

$M$  = Molmasse

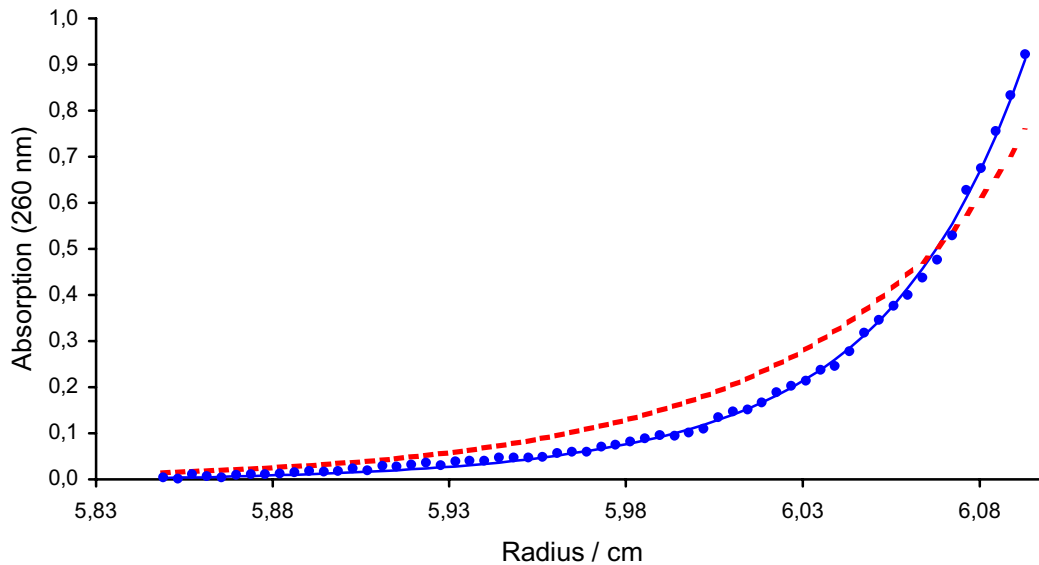
$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen des sedimentierenden Teilchens

$\rho$  = Dichte der Lösung, in der das Teilchen sedimentiert

$R$  = Gaskonstante

Um mit diesem Verfahren die Molmasse bestimmen zu können, ist eine genaue Kenntnis des partiellen spezifischen Volumens notwendig. Für Proteine und Nucleinsäuren ist  $\bar{v}$  unabhängig von der Konformation und daher aus der Aminosäurezusammensetzung bzw. den Nukleotidanteilen berechenbar (Laue *et al.*, 1992). In erster Näherung gilt für Proteine  $\bar{v} = 0,735 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ . Mit der Gleichgewichtszentrifugation können auch Mischungen und miteinander Komplexe bildende Teilchen analysiert werden (Pingoud und Urbanke, 1997).

Somit ist die Gleichgewichtszentrifugation eine gute Möglichkeit die Stöchiometrie der Bindung der Dam DNA-MTase an doppelsträngige DNA zu untersuchen. Für diese Untersuchung werden insgesamt 21 Proben mit verschiedenen Stöchiometrien zwischen der Dam DNA-MTase und DamP(A2Ap)18h (1:0,7 bis 1:10) in Gegenwart von AdoMet (5  $\mu\text{M}$ ) und in Abwesenheit von AdoMet hergestellt und die Konzentrationsgradienten bei 22000 rpm gemessen. In Abb. 15 ist der gemessene Konzentrationsverlauf einer Lösung aus Dam DNA-MTase (4,3  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von DamP(A2Ap)18h (0,87  $\mu\text{M}$ ) dargestellt.



**Abb. 15:** Konzentrationsverteilung eines Gleichgewichtsexperimentes mit Dam DNA-MTase ( $4,3 \mu\text{M}$ ) und DamP(A2Ap)18h ( $0,87 \mu\text{M}$ ) bei 22000 rpm. Die einzelnen Messpunkte ( $\bullet$ ) werden am besten durch die blaue Kurve beschrieben, die die theoretische Konzentrationsverteilung der unabhängigen Bindung von zwei Dam DNA-MTase Molekülen mit einer Bindungskonstante  $k_D$  von  $1 \mu\text{M}$  an die DNA repräsentiert. Die rote Linie gibt die berechnete Verteilung bei der Bindung eines Dam DNA-MTase Moleküls an die DNA wieder.

Für die Auswertung der einzelnen Konzentrationsverteilungen werden zwei Modelle herangezogen. Im ersten Modell bindet ein Molekül Dam DNA-MTase an die DNA. In Abb. 15 ist der berechnete Konzentrationsverlauf für dieses Modell in rot eingezeichnet. Die Abweichung vom gemessenen Verlauf ist signifikant, so dass unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden kann, dass nur ein Dam DNA-MTase Molekül an die DNA bindet. Die Kurvenanpassung an die gemessenen Daten ist für die unabhängige Bindung von zwei Molekülen Dam DNA-MTase an die DNA wesentlich besser. Dabei wurde eine Dissoziationskonstante  $k_D$  für die Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA von  $1 \mu\text{M}$  angenommen.

Bei den Messungen in Anwesenheit und ohne AdoMet wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Der Cofaktor scheint lediglich bei dieser Messung einen Einfluß auf die Stabilität der Dam DNA-MTase zu haben. Die Anwesenheit von AdoMet scheint die Aggregationstendenz der Dam DNA-MTase zu verringern.

Es ist somit gezeigt, dass die Dam DNA-MTase auch unter nativen Bedingungen als Dimer an die DNA bindet. Mit der analytischen Gleichgewichtsupracentrifugation kann allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob sich ausschließlich ein 2:1-Komplex bildet oder ob bei geringeren Konzentrationen auch ein 1:1-Komplex vorliegen kann.

### 3.3 DNA-Bindung der Dam DNA-MTase

DNA-Bindungsstudien werden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  zwischen dem Protein und der DNA durchgeführt. Da die Affinitäten zwischen den Proteinen und der DNA im allgemeinen sehr hoch sind und die Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich zu finden sind, müssen sehr empfindliche und möglichst störungsfreie Methoden eingesetzt werden.

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten in Lösung wird häufig die Fluoreszenzspektroskopie verwendet. Prinzipiell kann man eine intrinsische und oder eine extrinsische Fluoreszenz für diese Messungen verwenden. Bei Proteinen wird die Tryptophanfluoreszenz als intrinsische Fluoreszenz gemessen. Die Verwendung der Tryptophanfluoreszenz erlaubt die Beobachtung eines Protein-Substrat-Systems, ohne dass das Protein oder sein Substrat chemisch modifiziert werden müssen. Somit kommt es auch zu keinerlei Artefakten, die möglicherweise durch eine chemische Modifikation verursacht werden. Mit dieser Methode wurden bereits verschiedene Proteine aus Restriktions-Modifikations-Systemen näher charakterisiert (Baldwin, 1995; Reich, 1991). Bei Messung der extrinsischen Fluoreszenz wird der Fluorophor durch eine chemische Reaktion entweder mit dem Protein oder mit dem Substrat gekuppelt.

In dieser Arbeit wird ausschließlich der extrinsische Fluorophor 2-Aminopurin (2-Ap) verwendet, dessen Eigenschaften bereits beschrieben wurden. Zwangsläufig mußte dieser Fluorophor verwendet werden, da innerhalb der Aminosäuresequenz der Dam DNA-MTase lediglich zwei Tryptophanreste vorhanden sind und diese keine Signaländerung bei der Bindung an die DNA aufweisen.

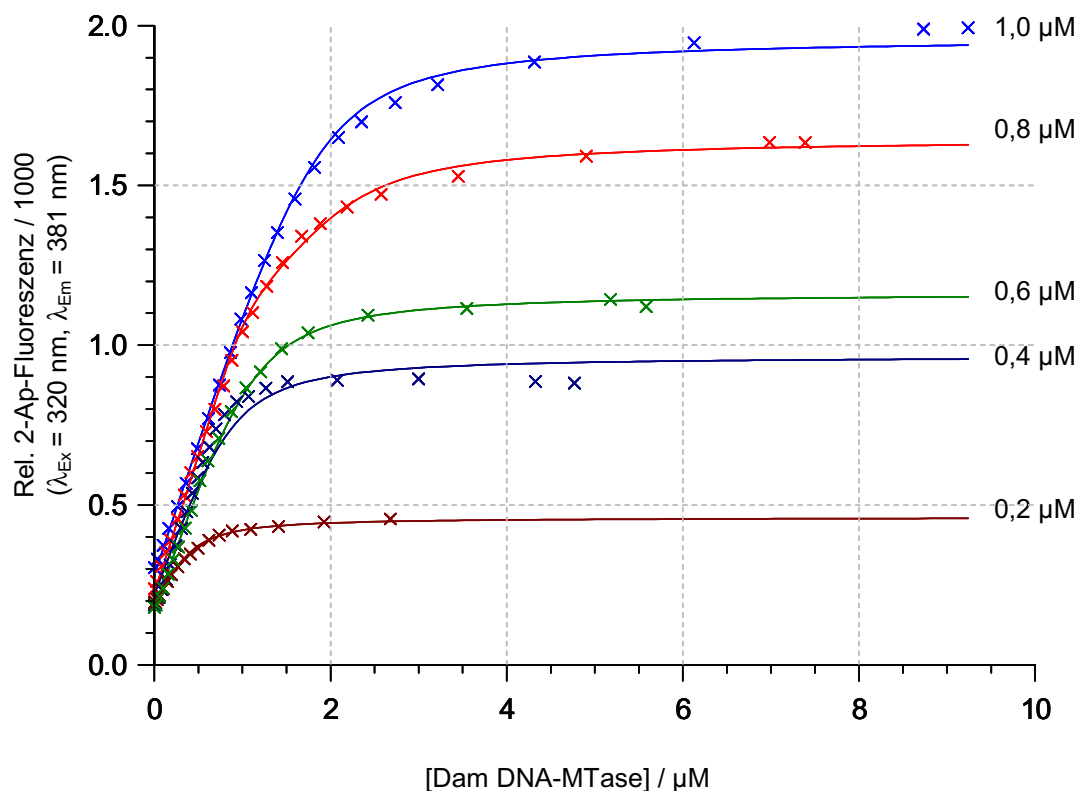
Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Dam DNA-MTase tatsächlich als Dimer an die DNA binden kann, gilt es nun in direkten Titrations die  $K_D$ -Werte für diese Bindung zu bestimmen.

#### 3.3.1 Fluoreszenztitrations mit 2-Ap haltigen Duplex-ODN und der Dam DNA-MTase

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  von Dam DNA-MTase und DamP(A2Ap)18h wird durch Beobachtung der 2-Ap-Fluoreszenz durchgeführt. Für die



Auswertung der Daten werden insgesamt fünf verschiedene Konzentrationen von DamP(A2Ap)18h im Bereich von 0,2  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$  vorgelegt und jeweils sukzessive Dam DNA-MTase hinzutitriert. Das Ergebnis dieser Titrations ist in Abb. 16 dargestellt.

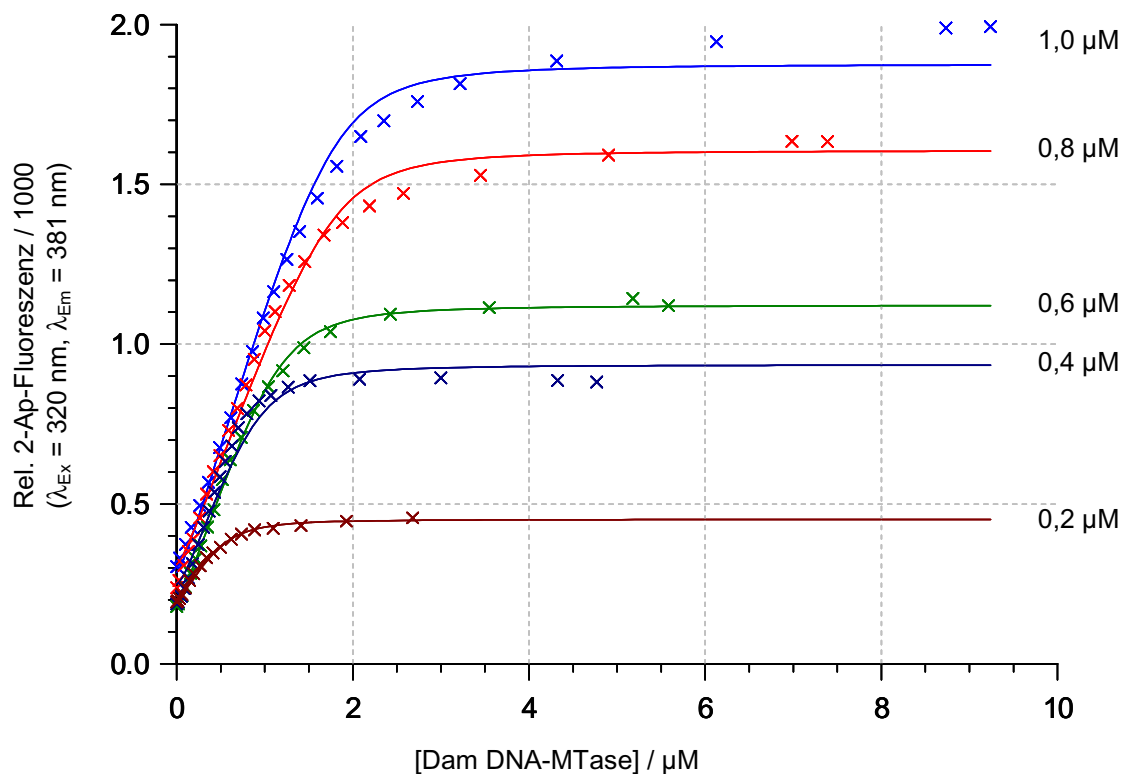


**Abb. 16:** *Global-Fit* Analyse der 2-Ap-Fluoreszenz Titrations von verschiedenen Konzentrationen an DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase. Zugrunde gelegt wird ein Modell A, in dem die Bindung beider Dam DNA-MTase Moleküle einen Beitrag zur 2-Ap-Fluoreszenz hat.

In die Auswertung gehen alle gemessenen Konzentrationen gleichzeitig ein. Da nicht klar ist, welches Dam DNA-MTase Molekül bei seiner Bindung die Fluoreszenzänderung verursacht, müssen drei Möglichkeiten geprüft werden. Theoretisch kann schon die Bindung der ersten Dam DNA-MTase die gesamte Fluoreszenzänderung verursachen. Es ist allerdings auch denkbar, dass erst die Bindung der zweiten Dam DNA-MTase an die DNA zum Fluoreszenzanstieg führt. Als dritte Möglichkeit können beide Bindungen Beiträge zum Anstieg der 2-Ap-Fluoreszenz liefern. Die beste Übereinstimmung der gemessenen Daten liefert das Modell A, bei dem die Signaländerung der 2-Ap-Fluoreszenz sowohl durch Bindung der ersten Dam DNA-MTase als auch durch Bindung der zweiten Dam DNA-MTase verursacht wird (vgl. Abb. 16). Aus diesen Fluoreszenztitrations resultiert ein  $K_{D1}$  für die Bindung der ersten Dam DNA-MTase von  $112 \pm 26$  nM und ein  $K_{D2}$  für die Bindung der

zweiten Dam DNA-MTase von  $224 \pm 33$  nM. Für die beiden anderen Modelle waren die Abweichungen von den gemessenen Daten wesentlich größer. Die Dissoziationskonstanten für die Bindungen der ersten und der zweiten Dam DNA-MTase unterscheiden sich nur geringfügig, so dass bei geringeren Konzentrationen ein Gemisch aus 1:1- und 2:1-Komplex vorliegen sollte.

Prinzipiell stellt sich die Frage, ob die Dam DNA-MTase Moleküle nacheinander an die DNA binden oder sich auch ein Dimer in Lösung bildet, der dann anschließend an die DNA binden kann (Modell B). Da beide Wege möglich erscheinen, werden die Daten auch mit diesem Modell B ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.



**Abb. 17:** *Global-Fit* Analyse der 2-Ap-Fluoreszenz Titrations von verschiedenen Konzentrationen an DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase. Die Auswertung erfolgt mit dem Modell B, bei dem sich erst ein Dam DNA-MTase Dimer bildet und dieser dann anschließend an die DNA bindet.

Aus den Daten der 2-Ap-Fluoreszenztitrations ergibt sich eine Dissoziationskonstante  $K_{D3}$  für eine vorgelagerte Dimerisierung der Dam DNA-MTase von  $25 \mu\text{M}$  und ein  $K_{D4}$  für die anschließende Bindung an die DNA von  $2,8 \pm 0,8$  nM. Betrachtet man Abb. 17, so erkennt man, dass die berechneten Daten bei  $0,8 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  DamP(A2Ap)18h mit den gemessenen Daten schlecht übereinstimmen. Außerdem wurde in Gelfiltrationsexperimenten niemals ein

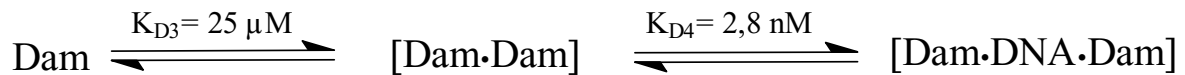
Dam DNA-MTase-Dimer beobachtet. Doch zeigt die Auswertung, dass auch dieses Modell denkbar ist.

Mit den erhaltenen Ergebnissen kann folgendes Gleichgewichtsschema aufgestellt werden.

### Modell A



### Modell B

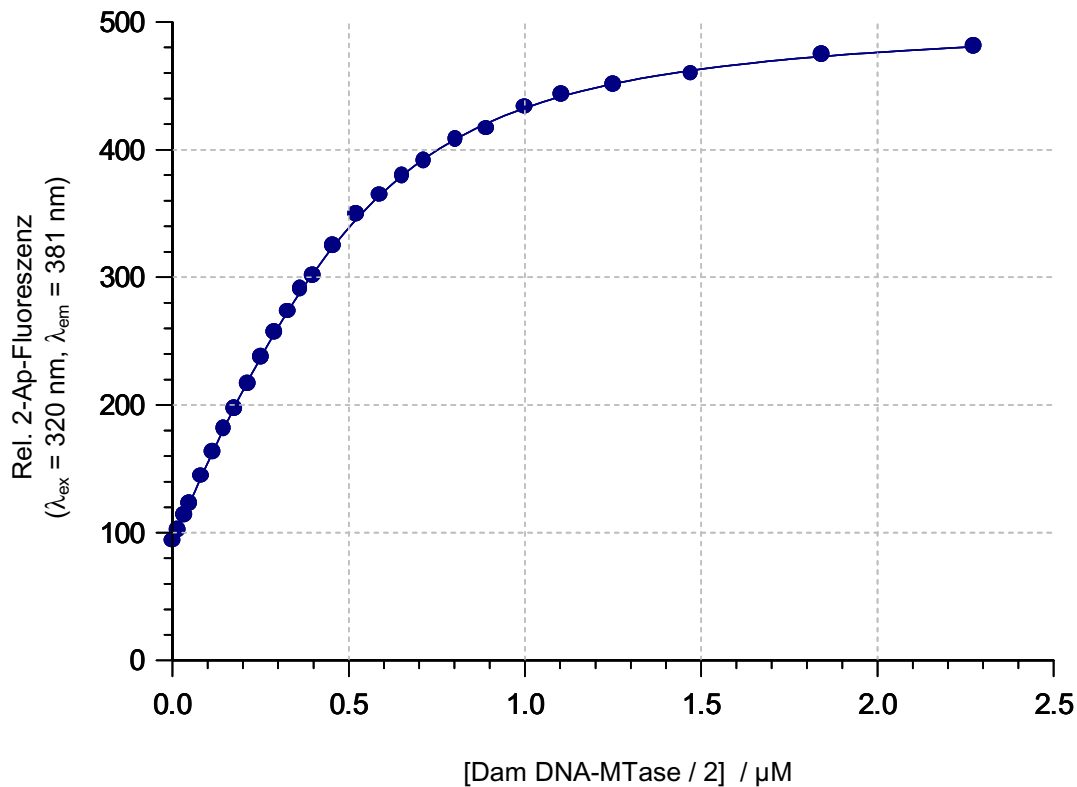


**Abb. 18:** Schema der möglichen Interaktionen zwischen Dam DNA-MTase und DNA (DamP(A2Ap)18h). Die eingetragenen Dissoziationskonstanten sind mittels Fluoreszenztitrationen ermittelt worden.

Vergleicht man den  $K_D$ -Wert der ersten Dam-Bindung an DamP(A2Ap)18h mit dem der Dimerisierung, so stellt man fest, dass der Wert für die Dimerisierung um etwa einen Faktor von 100 schlechter ist. Es wird somit die direkte Bindung einer Dam DNA-MTase an DamP(A2Ap)18h gegenüber der Dimerisierung bevorzugt. Hat sich jedoch das Dimer in der Lösung gebildet, so bindet es sehr stark direkt an die DNA. Gleichzeitig erkennt man auch, dass es sehr schwierig ist, ein Dam DNA-MTase Dimer in der Lösung nachzuweisen. Doch ist nicht auszuschließen, dass es sich bildet. Begünstigt wird jedoch die schrittweise Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA.

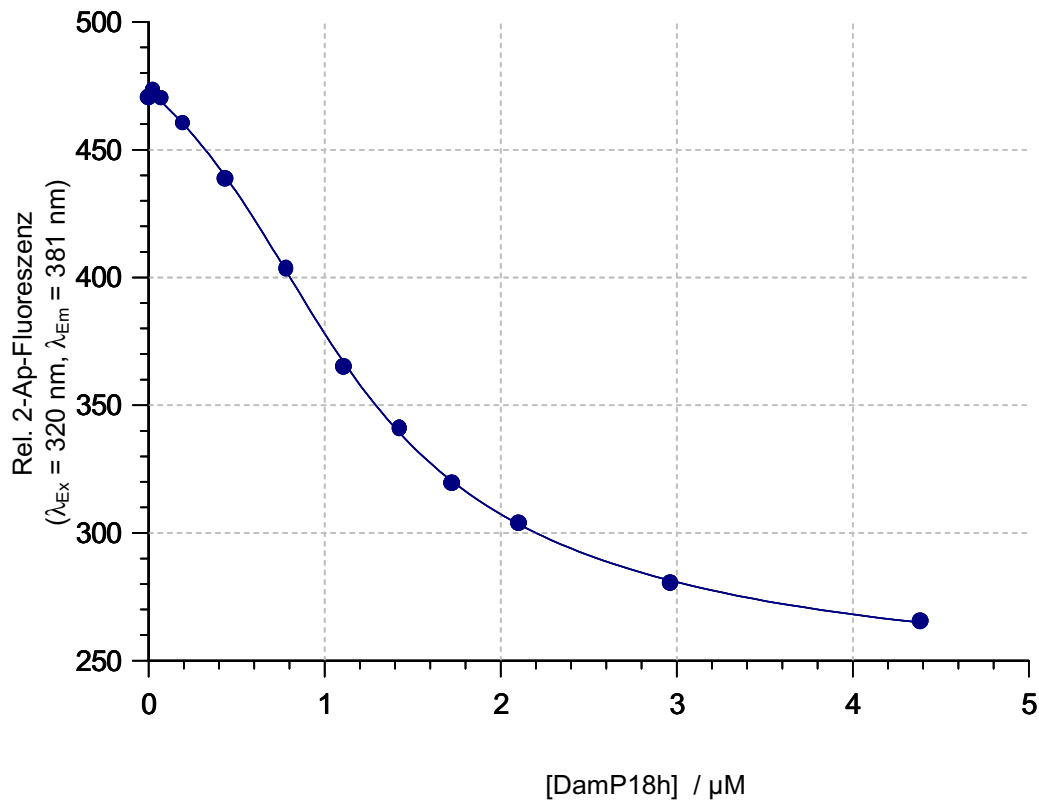
Mittels der 2-Ap-Fluoreszenz ist es nicht nur möglich den Basenausklapp-Mechanismus zu untersuchen und die  $K_D$ -Werte für die Bindung an DamP(A2Ap)18h zu bestimmen, sondern auch die Bindung der Dam DNA-MTase an natürliche DNA zu charakterisieren. Diese Charakterisierung wird entweder über eine direkte Verdrängung des markierten Duplex-ODN aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase durch das unmarkierte Duplex-ODN erreicht oder aber indem man eine kompetitive Titration der beiden Duplexe durchführt. Für die Dam DNA-MTase werden beide Möglichkeiten zur Bestimmung der  $K_D$ -Werte von unmodifizierter DNA verwendet.

Zunächst wird die Bindung der Dam DNA-MTase an DamP18h, also an die DNA, die das natürliche Substrat darstellt, charakterisiert. Für die kompetitive Bestimmung wird zu einem Gemisch aus 200 nM 2-Ap-markiertem Duplex-ODN (DamP(A2Ap)18h) und 400 nM unmarkiertem Duplex-ODN (DamP18h) sukzessive Dam DNA-MTase hinzugegeben und die Zunahme der 2-Ap-Fluoreszenz verfolgt. Die daraus resultierende Titrationskurve ist in Abb. 19 wiedergegeben.



**Abb. 19:** Kompetitive Titration von DamP(A2Ap)18h (200 nM) und DamP18h (400 nM) mit Dam DNA-MTase.

Damit die kompetitive Titration ausgewertet werden kann, wird angenommen, dass die Dam DNA-MTase als Dimer bindet. Um diesem Sachverhalt Rechnung zu tragen, wird die Dam DNA-MTase Konzentration, die hinzutitriert wird, durch zwei dividiert. Man erhält aus dieser Titration die Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung von Dam DNA-MTase an das 2-Ap-Duplex-ODN (DamP(A2AP)18h) von  $112 \pm 4 \text{ nM}$  und für die Bindung an das unmarkierte Duplex-ODN (DamP18h) von  $142 \pm 9 \text{ nM}$ . Die Titrationskurve der Verdrängung des markierten Duplex-ODN (200 nM) aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase ( $2 \mu\text{M}$ ) durch das unmarkierte Duplex-ODN (DamP18h) ist in Abb. 20 dargestellt.

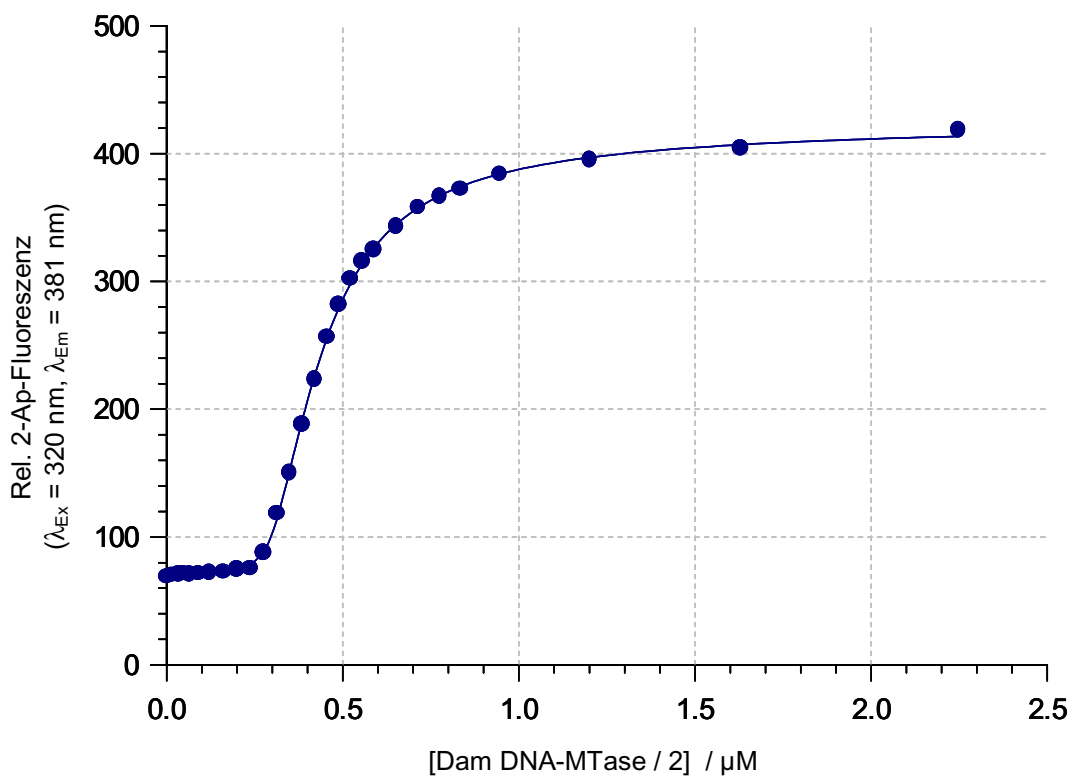


**Abb. 20:** Direkte Verdrängung von DamP(A2Ap)18h (200 nM) aus dem Komplex mit Dam DNA-MTase (2  $\mu\text{M}$ ) durch DamP18h.

Auch für die Auswertung der Verdrängungstiteration von DamP(A2Ap)18h (200 nM) aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase (2  $\mu\text{M}$ ) durch das unmarkierte Duplex-ODN (DamP18h) wird die Dam DNA-MTase als Dimer betrachtet und die Konzentration der DNA-MTase halbiert. Damit ergibt sich für die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Bindung der Dam DNA-MTase an das markierte Duplex-ODN ein Wert von  $298 \pm 137 \text{ nM}$  und für die Dissoziationskonstante der Bindung der Dam DNA-MTase an das unmarkierte Duplex-ODN (DamP18h) ein  $K_D$ -Wert von  $111 \pm 18 \text{ nM}$ . Auffällig bei dieser Titration ist, dass das markierte Duplex-ODN durch das unmarkierte Duplex-ODN nicht vollständig aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase verdrängt wird. Erkennbar ist dieses daran, dass der Anfangswert der rel. 2-Ap-Fluoreszenz (vgl. Abb. 19) aus der kompetitiven Titration nicht erreicht wird. Deshalb stimmen auch die  $K_D$ -Werte für die Bindung der Dam DNA-MTase an DamP(A2Ap)18h mit 112 nM und 289 nM weniger gut überein, als die  $K_D$ -Werte für die Bindung an das unmarkierte Duplex-ODN mit 142 nM und 111 nM.

Weitere Verdrängungstitrations werden mit einem anderen unmarkierten Duplex-ODN durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein hemimethyliertes Duplex-ODN, in dem das Zieladenin fehlt und durch eine abasische Stelle (1,2-Didesoxy-D-ribose) ersetzt wird (DamP(A2delta)18h). In vergleichbaren Titrations mit den N6-Adenin-DNA-MTasen *M·TaqI* (Holz *et al.*, 1999), *M·EcoRV* (Cal und Connolly, 1997) und *M·EcoRI* (Allan *et al.*, 1998) konnte gezeigt werden, dass die Affinität dieser DNA-MTasen zu Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle an der Zielposition um den Faktor vier bis sogar 200 höher ist.

Zunächst wird eine kompetitive Titration von markiertem Duplex-ODN DamP(A2Ap)18h (200 nM) und nicht markiertem Duplex-ODN DamP(A2delta)18h (300 nM) mit der Dam DNA-MTase durchgeführt. Das Ergebnis dieser Titration ist in Abbildung 21 dargestellt.

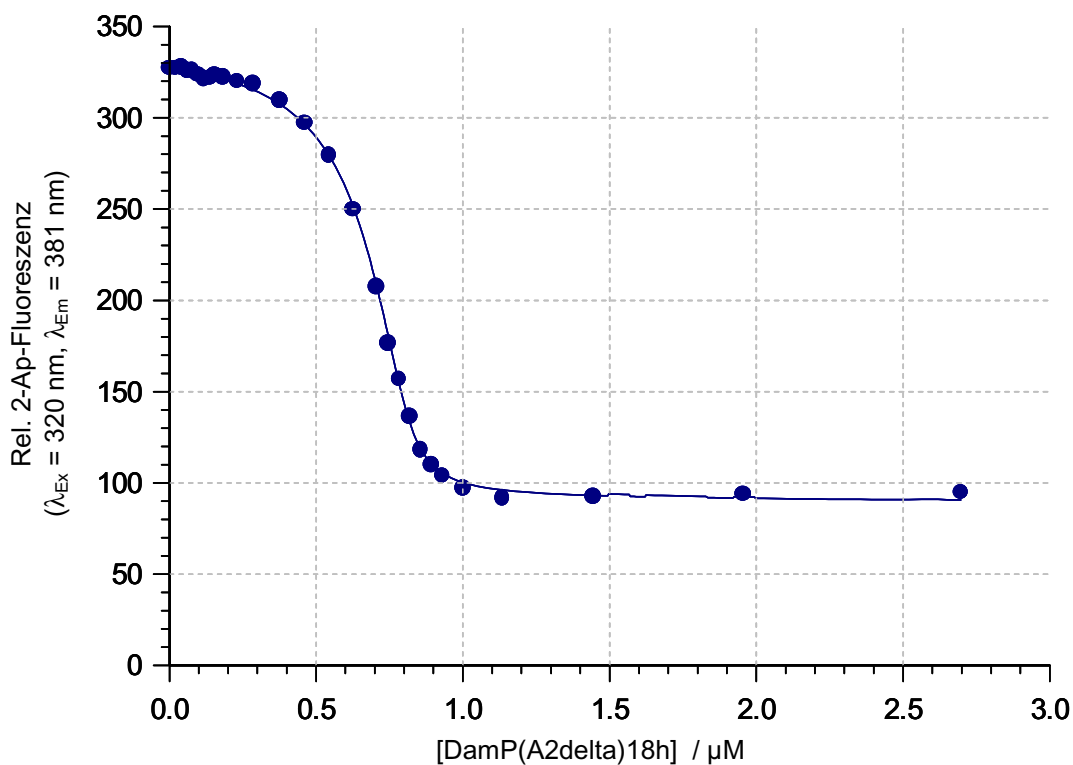


**Abb. 21:** Kompetitive Titration von DamP(A2Ap)18h (200 nM) und DamP(A2delta)18h (300 nM) mit Dam DNA-MTase.

Auch bei der Auswertung dieser kompetitiven Titration wird die hinzutitrierte Dam DNA-MTase Konzentration halbiert, da für die Auswertung angenommen wird, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Man erhält aus dieser Titration eine Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung von Dam DNA-MTase an das 2-Ap-Duplex-ODN

(DamP(A2AP)18h) von  $69 \pm 6$  nM und für die Bindung an das unmarkierte Duplex-ODN (DamP(A2delta)18h) von  $0,5 \pm 0,1$  nM. Die Dam DNA-MTase bindet somit um den Faktor 100 besser an ein Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle an der Zielposition als an ein 2-Ap-haltiges oder ein natürliches Duplex-ODN. Dieses Ergebnis entspricht den oben genannten Beobachtungen mit anderen DNA-Mtasen. Betrachtet man den Verlauf der 2-Ap-Fluoreszenz, so erkennt man, dass der Anstieg deutlich verzögert wird. Da die Bindung der Dam DNA-MTase an das nicht markierte Duplex-ODN sehr viel besser ist als an das markierte, bindet die DNA-MTase zunächst nur an das nicht markierte Duplex-ODN und man erhält keine Änderung der 2-Ap-Fluoreszenz. Erst wenn so gut wie alle Bindungsstellen am nicht markierten Duplex-ODN abgesättigt sind, bindet die Dam DNA-MTase an das markierte Duplex-ODN und man beobachtet die erwartete Fluoreszenzzunahme. Mit dieser Titration wird auch die Dissoziationskonstante für die Bindung der Dam DNA-MTase an das 2-Ap-haltige Duplex-ODN mit 69 nM erneut bestätigt.

Auch mittels einer direkten Verdrängung von DamP(A2Ap)18h (150 nM) aus dem Komplex mit Dam DNA-MTase (2  $\mu$ M) mit DamP(A2delta)18h wird dieses Ergebnis bestätigt. Die Titrationskurve ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22:** Direkte Verdrängung von DamP(A2Ap)18h (150 nM) aus dem Komplex mit Dam DNA-MTase (2  $\mu$ M) durch DamP(A2delta)18h.

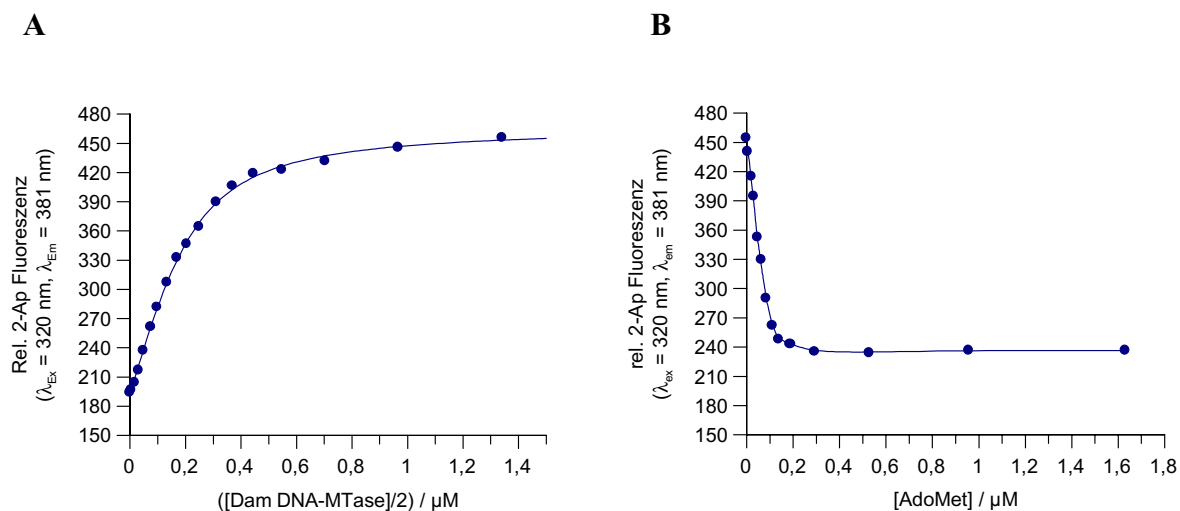
Für die Auswertung der direkten Verdrängungstitration wird erneut die Dam DNA-MTase Konzentration halbiert, da angenommen wird, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Man erhält aus der direkten Verdrängungstitration eine Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung der Dam DNA-MTase an das 2-Ap-markierte Duplex-ODN DamP(A2Ap)18h von  $62 \pm 0,1$  nM und für die Bindung an das nicht markierte Duplex-ODN einen Wert von 0,6 nM. Die  $K_D$ -Werte aus der direkten Verdrängungstitration stimmen somit sehr gut mit den  $K_D$ -Werten aus der kompetitiven Titration überein. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die Dissoziationskonstante für die Bindung der Dam DNA-MTase an ein 2-Ap-haltiges Duplex-ODN, die durch direkte Titration und durch Verdrängungstitration erhalten wurde, bei ca. 100 nM liegt und die Dissoziationskonstante für das natürliche Duplex-ODN DamP18h in der selben Größenordnung liegt. Die Dissoziationskonstante des Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle an der Zielposition DamP(A2delta)18h ist dagegen mindestens um den Faktor 100 kleiner und somit im Bereich  $< 1$  nM. Wie könnte man diese bessere Bindung an das Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle erklären?

Für eine Erklärung betrachtet man die Energien, die überwunden werden müssen, um die Zielbase aus der DNA herauszuklappen. Zunächst müssen für das Herausklappen des Adenins die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Partnerbase Thymin aufgehoben werden. Weiterhin müssen auch die Basenstapelwechselwirkungen zu den Nachbarbasen Guanin und Thymin aufgebrochen werden. Bei beiden Vorgängen wird Energie verbraucht. Im ausgeklappten Zustand wird Energie gewonnen, wenn das Zieladenin Stapelwechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit dem aktiven Zentrum der Dam DNA-MTase ausbildet. Im Fall der C5-Cytosin DNA-MTasen M·*Hha*I (Klimasauskas *et al.*, 1994) und M·*Hae*III (Reinisch *et al.*, 1995) kann zudem eine Proteinschleife in das innerhalb der DNA entstandene Loch schwenken und dort hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen mit den umgebenden DNA-Basen aufnehmen. Ist jedoch die Zielbase erst gar nicht vorhanden, so können diese Wechselwirkungen aufgenommen werden, ohne das Energie für das Herausklappen der Zielbase aufgebracht werden muß. Die Folge dessen ist eine bessere Bindung und damit eine kleinere Dissoziationskonstante für die Bindung der Dam DNA-MTase an ein Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle.



### 3.3.2 Bindung des Cofaktors AdoMet an die Dam DNA-MTase in Gegenwart von 2-Ap-markiertem Duplex-ODN

Die 2-Ap Fluoreszenz von Duplex-ODN kann nicht nur zum Nachweis eines Basenausklapp-Mechanismus und zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $k_D$  der Bindung der Dam DNA-MTase an nicht fluoreszierende Duplex-ODN sondern auch zur Untersuchung der Bindung des Cofaktors AdoMet an die Dam DNA-MTase genutzt werden. Bei Titrationen von 2-Ap-haltiger Duplex-ODN mit der Dam DNA-MTase aus dem Bakteriophagen T4 wurde zunächst ein 50-facher Anstieg der 2-Ap-Fluoreszenz beobachtet. Bei Zugabe von AdoMet zu dieser Lösung nahm die Fluoreszenz jedoch um die Hälfte ab (Malygin *et al.*, 2001). Eine vergleichbare Titration wird mit der Dam DNA-MTase aus *E. coli* durchgeführt. Im ersten Teil der Titration wird eine 200 nM DamP(A2Ap)18h Lösung vorgelegt und sukzessive Dam DNA-MTase zugegeben. Dabei wird die Zunahme der 2-Ap-Fluoreszenz verfolgt. Bei einer Konzentration von 2,6  $\mu\text{M}$  Dam DNA-MTase in der Lösung wird im zweiten Teil der Titration AdoMet sukzessive zugegeben. Die Ergebnisse dieser Titration sind in Abb. 23 A und B dargestellt.

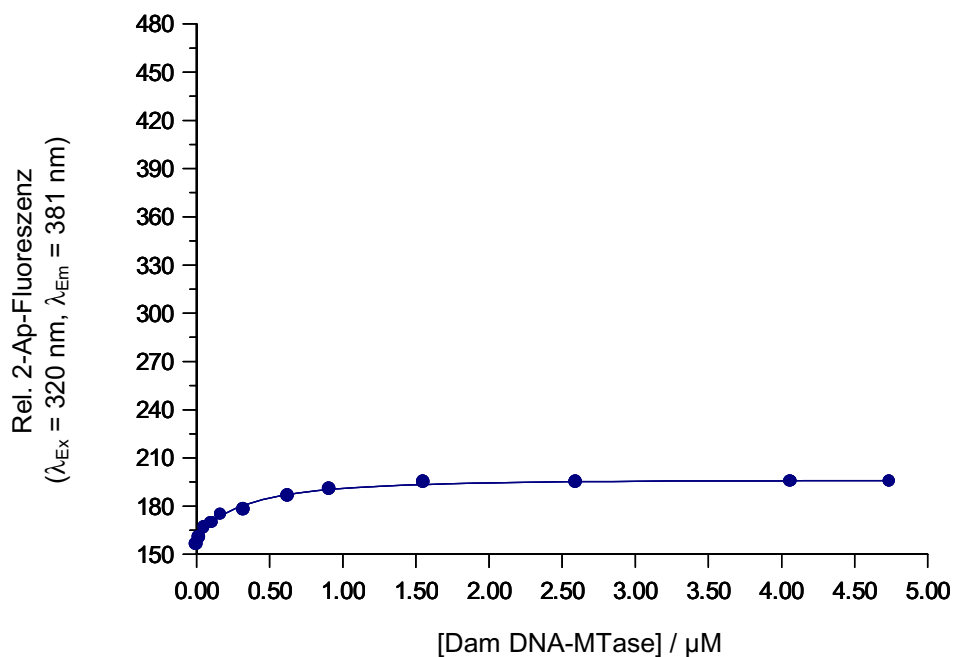


**Abb. 23:** **A.** Direkte 2-Ap-Fluoreszenztitration von 200 nM DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase.  
**B.** Nach Erreichen der 2-Ap-Fluoreszenzsättigung bei 2,6  $\mu\text{M}$  Dam DNA-MTase wird AdoMet sukzessive zugegeben.

Betrachtet man das Ergebnis dieser Titration, so sieht man im ersten Teil eine Zunahme der 2-Ap-Fluoreszenz infolge des Ausklappens der Zielbase. Gibt man nun zu dieser Lösung den Cofaktor AdoMet, so beobachtet man einen starken konzentrationsabhängigen Abfall der

2-Ap-Fluoreszenz um 83 % bezogen auf den Gesamtanstieg. Aus den beiden Titrations erhält man unter der Annahme, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet eine Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung des Dimers an das 2-Ap-haltige Duplex-ODN von  $66 \pm 8$  nM. Dieses ist in guter Übereinstimmung mit den bisherigen Titrations. Wertet man den zweiten Teil der Titration, also die Zugabe des Cofaktors AdoMet aus, so erhält man eine Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung des Cofaktors an die DNA-gebundene Dam DNA-MTase von  $3,6 \pm 0,7$  nM. Bei Zugabe des Cofaktors AdoMet wird die 2-Ap Fluoreszenz stark herabgesetzt. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der 2-Ap-Fluoreszenz könnte ein teilweises Zurückklappen des Basenanalogs sein. Eine weitere mögliche Erklärung dafür ist, dass der Komplex aus DNA und Dam DNA-MTase durch das Binden von AdoMet eine Konformationsänderung erfährt. Als Folge dessen könnte die Umgebung des ausgeklappten 2-Ap-Fluorophors hydrophober werden und daraus eine Fluoreszenzabnahme resultieren.

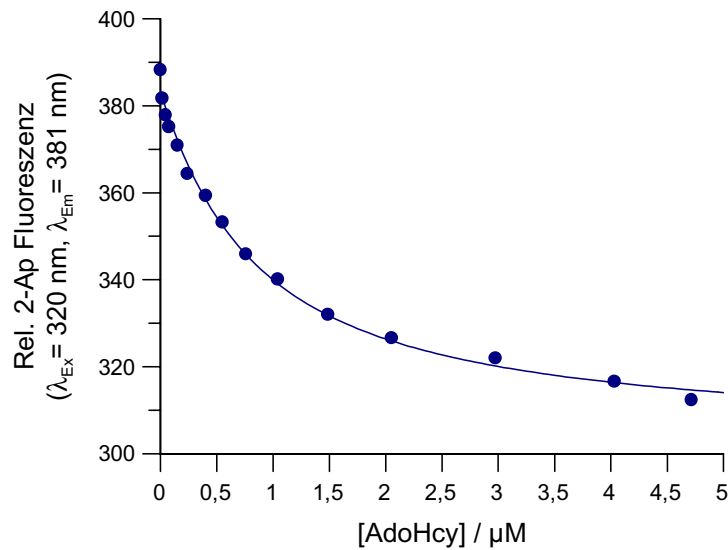
Des weiteren wird untersucht, ob sich die Dissoziationskonstante für die Bindung der Dam DNA-MTase an das 2-Ap-haltige Duplex-ODN in Gegenwart des Cofaktors ändert. Für diese Untersuchung wird eine direkte Titration von 200 nM DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase in Gegenwart von 50  $\mu$ M AdoMet durchgeführt. Das Ergebnis dieser Fluoreszenztitration ist in Abb. 24 dargestellt.



**Abb. 24:** Direkte Titration von 200 nM DamP(A2Ap)18h mit Dam DNA-MTase in Gegenwart von 50  $\mu$ M AdoMet.

Aus der Titration erhält man als Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung der Dam DNA-MTase an das 2-Ap-haltige Duplex-ODN DamP(A2Ap)18h in Gegenwart von AdoMet einen Wert von  $53 \pm 23$  nM. Dieser  $K_D$ -Wert stimmt gut mit einem in der Literatur angegebenen Wert von 60 – 70 nM überein (Bergerat *et al.*, 1990). In dieser Veröffentlichung wurde die Dissoziationskonstante der Bindung der Dam DNA-MTase an 14 Basenpaare-lange Duplex-ODN in Gegenwart von AdoMet durch Gelshiftexperimente bestimmt. Sowohl in den in dieser Arbeit durchgeführten Titrations mit 2-Ap als auch in den in der Literatur beschriebenen Gelshiftexperimenten scheint die Anwesenheit des Cofaktors keinen deutlichen Einfluß auf die DNA-Bindung der Dam DNA-MTase zu haben. Vergleicht man allerdings die beiden Titrationskurven (Abb. 23a und Abb. 24) miteinander, so stellt man einen deutlichen Unterschied fest. So ist die Amplitude der Titration in Gegenwart von AdoMet mit lediglich 35 % Fluoreszenzzunahme bezogen auf die Fluoreszenzänderung ohne Cofaktor sehr viel geringer. Dieses ist auf den bereits beschriebenen Einfluß des Cofaktors bezüglich der 2-Ap-Fluoreszenz zurückzuführen. Wertet man die Titration (Abb. 24) in Gegenwart von AdoMet unter Beachtung der 2:1-Stöchiometrie mit dem Modell A aus, bei dem die Signaländerung der 2-Ap-Fluoreszenz sowohl durch Bindung der ersten Dam DNA-MTase als auch durch Bindung der zweiten Dam DNA-MTase verursacht wird, so wird der  $K_{D1}$  für die Bindung der ersten Dam DNA-MTase kleiner und der  $K_{D2}$  für die Bindung der zweiten Dam DNA-MTase erhöht. Der Einfluß des Cofaktors auf die beiden Dissoziationskonstanten wird aufgrund der geringen Amplitude nur qualitativ beschrieben.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung des Cofaktor-Produktes AdoHcy an DNA-gebundene Dam DNA-MTase bestimmt. Dafür wird eine Lösung von 200 nM 2-Ap-haltigem Duplex-ODN (DamP(A2Ap)18h) mit 2  $\mu$ M Dam DNA-MTase vorgelegt und AdoHcy sukzessive hinzugegeben. Das Ergebnis dieser Titration ist in Abb. 25 dargestellt.



**Abb. 25:** Titration von 200 nM DamP(A2Ap)18h und 2  $\mu\text{M}$  Dam DNA-MTase mit AdoHcy.

Aus der direkten Fluoreszenztitration erhält man für die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Bindung von AdoHcy an die Dam DNA-MTase in Gegenwart von Duplex-ODN einen Wert von  $753 \pm 79$  nM. Vergleicht man das Ergebnis mit dem  $K_D$ -Wert von AdoMet, so bindet AdoHcy in Gegenwart von Duplex-ODN rund 200 mal schlechter an die Dam DNA-MTase. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich der Enzymkatalyse verständlich, denn die Aufgabe der DNA-MTase ist es, die Methylgruppe von AdoMet auf das Zieladenin zu übertragen, und somit ist es sinnvoll, dass das Cofaktor-Substrat besser bindet als das Cofaktor-Produkt.

### **3.4 Transientenkinetik der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase**

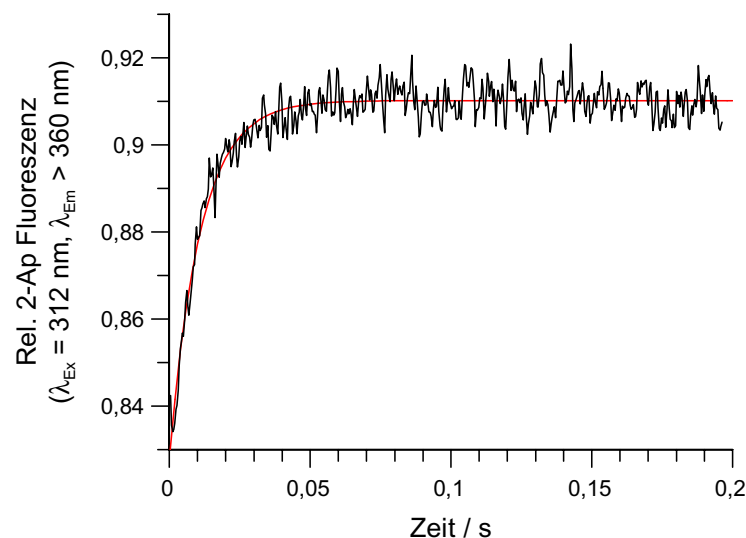
In den letzten Jahrzehnten wurde eine große Zahl von Methoden zur Erfassung schneller Reaktionen entwickelt. Die teilweise sehr verschiedenartigen Verfahren lassen sich weitgehend auf ein übereinstimmendes Grundschema zurückführen. Charakteristisch für eine Methode ist ein Bauteil, das der Auslösung der schnellen Reaktion dient. Die Art dieses Bauteils bestimmt den durch die jeweilige Methode erfassbaren Zeitbereich, wie auch den Typ der zu untersuchenden Reaktionen. Zur Auswahl einer geeigneten Methode ist daher nicht nur die Zeitauflösung, sondern auch die Anwendbarkeit für eine spezielle Reaktion entscheidend. Das Prinzip der Fluß- oder Strömungsmethoden beruht auf einer raschen Durchmischung der Reaktanden. Sie eignen sich daher besonders zur Verfolgung schneller enzymatischer Reaktionen und zum Studium enzymatischer Mechanismen. Mit einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich sind sie in der Skala schneller Reaktionen jedoch vergleichsweise langsam. Bis zu tausendfach schnellere Reaktionen sind mit den Relaxationsmethoden meßbar, deren Prinzip auf einer kurzzeitigen Störung des Gleichgewichts einer Reaktion beruht. Entsprechend lassen sich nur Reaktionen nahe am Gleichgewicht verfolgen. Zu solchen Reaktionen zählen Ligandenbindungen, Isomerisierungen oder spontane und induzierte Konformationsänderungen bei Makromolekülen. Die noch schnelleren Bestrahlungsmethoden setzen die Sensitivität des Systems gegenüber Lichtimpulsen voraus. Allen diesen Methoden gemeinsam sind die Verfahren zur Erfassung des Reaktionsverlaufes nach dessen Initiierung, die sich nach der Art der Reaktion und weniger nach der zeitlichen Auflösung richten. Für Enzymreaktionen eignen sich vor allem optische Verfahren wie UV/VIS-, Fluoreszenz-, CD-, ESR- und NMR-Spektroskopie. Das dritte wichtige Bauteil bei der Erfassung schneller Reaktionen ist eine Vorrichtung zur raschen Registrierung der Meßsignale, wobei auch weitgehend übereinstimmend entweder Speicheroszillographen oder computergesteuerte schnelle Speicher zum Einsatz kommen. Letztere ermöglichen eine unmittelbare Auswertung und Verarbeitung der Meßdaten.

In dieser Arbeit werden schnelle Prozesse, wie z.B. die Substratbindung, mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik verfolgt. Dabei werden die Reaktionspartner getrennt in Spritzen gefüllt und durch einen schnellen Stoß über eine Mischzelle in die Beobachtungskammer entleert. In dieser wird, nach dem der Fluß zum Stillstand gekommen ist, der Reaktionsverlauf verfolgt. Bei dieser Beobachtungskammer handelt es sich um eine photometrische Küvette, die so angeordnet ist, dass der optische Strahl für Absorptionsmessungen senkrecht zur Strömungsrichtung durchfällt. Bei fluorimetrischen Messungen wird das Fluoreszenzlicht

senkrecht zur Anregung beobachtet. Auf diese Weise kann man die zu einzelnen Schritten einer Reaktion gehörigen Geschwindigkeitskonstanten analysieren und so detaillierte Informationen über den Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion erhalten.

### 3.4.1 Kinetische Untersuchung der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase

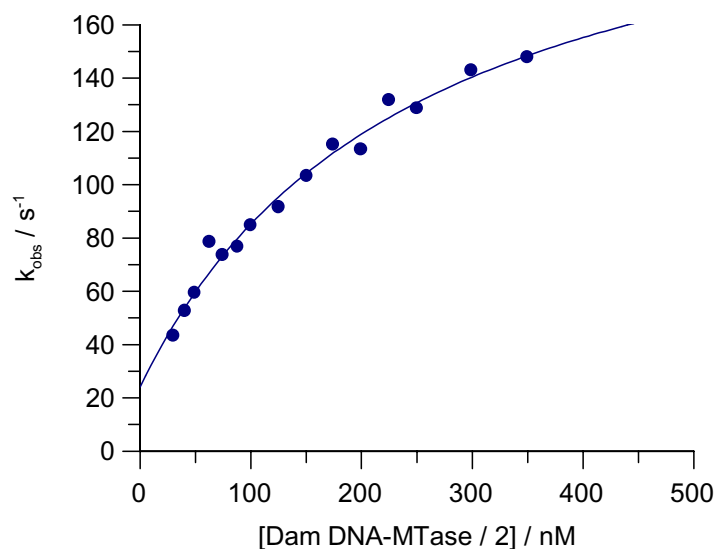
Mit dem Adeninanalogue 2-Ap steht eine Fluoreszenzsonde zur Verfügung, die es erlaubt, die schnelle DNA-Bindungskinetik der Dam DNA-MTase zu untersuchen. Wie bereits beschrieben, kommt es durch Zugabe von Dam DNA-MTase zu DamP(A2Ap)18h zu einem Anstieg der 2-Ap-Fluoreszenz. Zur kinetischen Analyse dieser Fluoreszenzänderung werden Lösungen von 20 nM Duplex-ODN mit Überschussmengen an Dam DNA-MTase am Stopped-Flow-Gerät untersucht. In Abb. 26 ist die Assoziation von Dam DNA-MTase und DamP(A2Ap)18h dargestellt.



**Abb. 26:** Assoziation von 300 nM Dam DNA-MTase und 20 nM DamP(A2Ap)18h. Die erhaltene Bindungskinetik kann durch eine einfach-exponentielle Gleichung (rot) beschrieben werden.

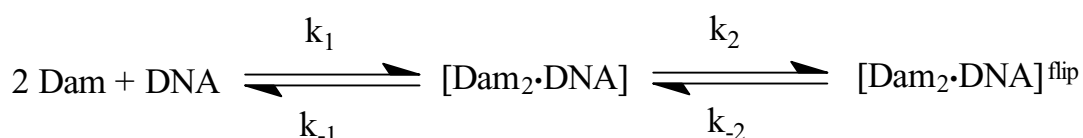
Man erkennt, dass die Assoziation der Dam DNA-MTase an Duplex-ODN durch eine einfach exponentielle Gleichung beschrieben werden kann. Wie bereits geschildert wird die Assoziation in Abhängigkeit von der Dam DNA-MTase Konzentration gemessen. Da die Dam DNA-MTase Konzentration dabei sehr viel größer als die Konzentration des Duplex-ODN ist, kann man in guter Näherung annehmen, dass die DNA-MTase Konzentration

während der Reaktion konstant ist und somit Bedingungen pseudo erster Ordnung vorliegen. Eine Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  der Assoziation gegen die Dam DNA-MTase Konzentration zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit. Diese ist in Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27:** Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  der Assoziation von Dam DNA-MTase und Dam(A2Ap)18h (20 nM) gegen die Dam DNA-MTase-Konzentration. Aufgrund der 2:1-Bindungsstöchiometrie der Dam DNA-MTase und dem Duplex ODN wurde zur Auftragung die Dam-Konzentration halbiert.

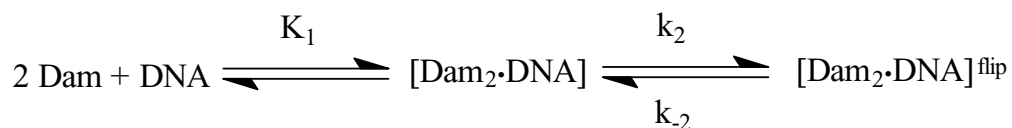
Die hyperbolische Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von der Dam DNA-MTase Konzentration zeigt, dass es sich bei der Assoziation der Dam DNA-MTase an die DNA mindestens um einen zwei Schritt-Mechanismus handelt. Der erste Schritt wird der initialen Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA zugeordnet und der zweite Schritt dem Herausklappen des 2-Ap-Rests aus der DNA. Es kann folgendes Schema aufgestellt werden.



Dabei wird angenommen, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Bei kleinen Dam DNA-MTase-Konzentrationen ist die initiale Bindung an die DNA geschwindigkeitsbestimmend. Sie erfolgt unter Diffusionskontrolle mit einer initialen bimolekularen Geschwindigkeitskonstante von  $1,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Creighton, 1993; Berg *et al.*,

1985). Mit zunehmenden Konzentrationen an Dam DNA-MTase wird die DNA-Bindung schneller und das Herausklappen des 2-Ap-Rests wird geschwindigkeitsbestimmend. Deshalb läuft die Funktion einem maximalen Wert für  $k_{obs}$  entgegen.

Unter der Annahme, dass  $k_{-1}$  viel größer ist als  $k_2$ , erfolgt die Einstellung des initialen Bindungsgleichgewichts schneller als das Herausklappen des 2-Ap-Rests. Deshalb kann die Bindung mit einem schnellen Gleichgewichtsreaktionsmechanismus beschrieben werden und das Reaktionsschema vereinfacht sich zu:



Die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  der Bindung folgt einer Hyperbel, die eine Funktion der Sättigung der ersten Teilreaktion, also der Bildung des initialen Dam DNA-MTase-DNA-Komplexes, ist und beschrieben wird durch:

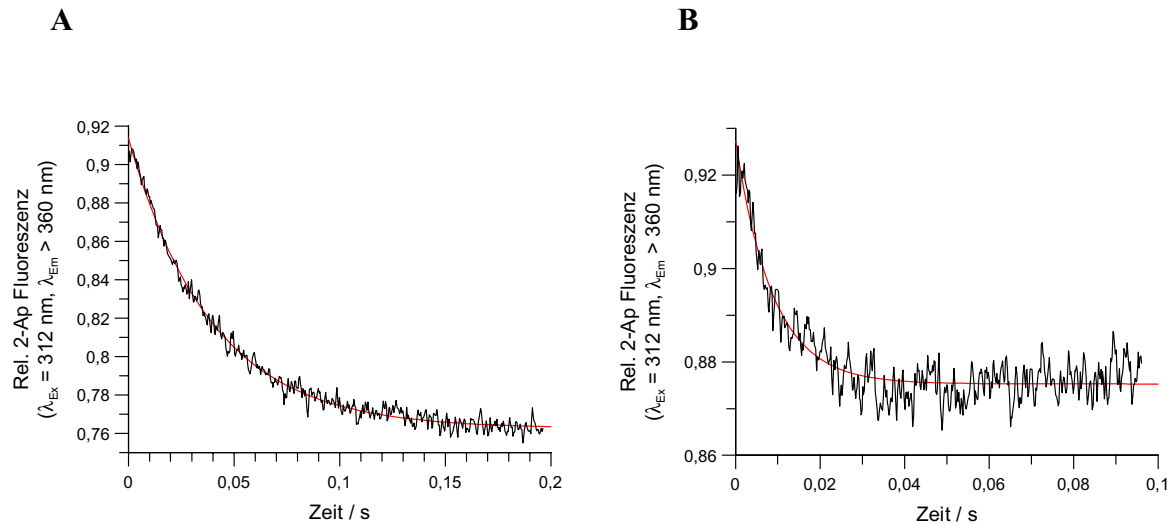
$$k_{obs} = \frac{K_1 k_2 [\text{Dam}]}{K_1 [\text{Dam}] + 1} + k_{-2}$$

Die maximale beobachtete Geschwindigkeitskonstante setzt sich aus der Summe der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2 + k_{-2}$  zusammen und der Achsenabschnitt entspricht  $k_{-2}$ , also der Geschwindigkeitskonstante für das Zurückklappen der Zielbase im Dam-DNA-Komplex. Durch die Auswertung der hyperbolischen Funktion, die die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  beschreibt, ergeben sich folgende Werte. Der Wert für die initiale Bindung  $1/K_1$  der Dam DNA-MTase an die DNA ist  $247 \pm 75$  nM. Das Ausklappen des 2-Ap-Rests erfolgt mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_{+2}$  von  $188 \pm 15$  s<sup>-1</sup> und das Zurückklappen mit  $k_{-2}$  von  $24 \pm 7$  s<sup>-1</sup>. Daraus ergibt sich ein  $K_{d2}$ -Wert für das Ausklapp-Gleichgewicht ( $k_{-2}/k_{+2}$ ) von 0,13. Mit  $K_D = K_{d1}K_{d2}$  ergibt sich für die Gesamtbindung ( $K_D$ ) ein Wert von 32 nM. Dieser ist etwas kleiner als der durch Gleichgewichtstitrationen bestimmte Wert (vgl. 3.3).

Zusätzlich wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{off}$  für die Gesamtbindung bestimmt. Dabei wird der Komplex aus DamP(A2Ap)18h und Dam DNA-MTase mit verschiedenen Konzentrationen an DamP(A2delta)18h verdrängt und parallel dazu der Komplex aus DamP(A2Ap)18h und Dam DNA-MTase mit zunehmenden Konzentrationen an DamP18h verdrängt. In Abb. 28 sind Beispiele für diese Verdrängungsexperimente gezeigt.

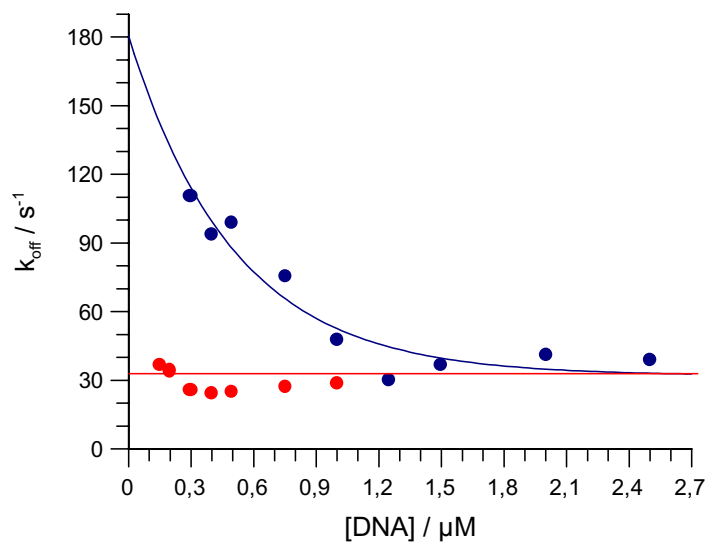


In Abb. 28 A ist die Verdrängungskinetik von 50 nM DamP(A2Ap)18h aus dem Komplex mit 250 nM Dam DNA-MTase durch 500 nM DamP(A2delta)18h dargestellt und in Abb. 28 B die Verdrängungskinetik von 100 nM DamP(A2Ap)18h aus dem Komplex mit 500 nM Dam DNA-MTase durch 300 nM DamP18h dargestellt. Wie erwartet nimmt bei beiden Verdrängungsexperimenten die 2-Ap-Fluoreszenz ab.



**Abb. 28:** Verdrängung von DamP(A2Ap)18h aus seinem Komplex mit der Dam DNA-MTase durch A: DamP(A2delta)18h und B: DamP18h. Beide Verdrängungskurven sind einphasig und können mit einer einfach-exponentiellen Gleichung ausgewertet werden.

Die einzelnen Verdrängungskurven sind einphasig und können somit einfach-exponentiell ausgewertet werden. Da diese Experimente in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweils verdrängenden Duplex-ODN durchgeführt werden, ist in Abb. 29 das Ergebnis der Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{\text{off}}$  dargestellt.



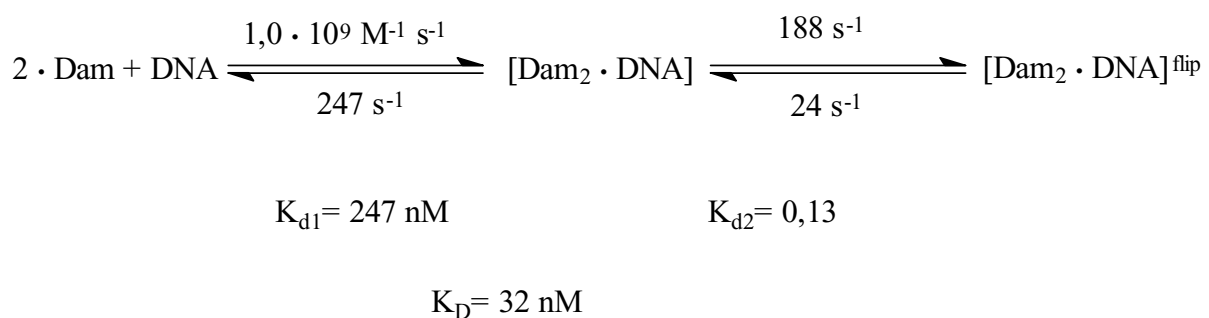
**Abb. 29:** Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{off}}$  für die Verdrängung von DamP(A2Ap)18h aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase durch DamP18h (blau) und DamP(A2delta)18h (rot).

In den Auftragungen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{off}}$  gegen die jeweiligen Duplex-ODN Konzentrationen spiegeln sich die unterschiedlichen  $K_D$ -Werte der beiden Duplex-ODN wieder. Führt man das Verdrängungsexperiment mit DamP(A2delta)18h durch, an das die Dam DNA-MTase um den Faktor 100 besser bindet als an das 2-Ap-haltige Duplex-ODN, so erkennt man, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{off}}$  konzentrationsunabhängig ist. Dieses spiegelt sich auch in den Amplituden der einzelnen Experimente wieder, denn diese bleiben bei den unterschiedlichen Konzentrationen nahezu unverändert. Dies zeigt, dass aufgrund der viel besseren Bindung der Dam DNA-MTase an das unmarkierte Duplex-ODN mit der abasischen Stelle das 2-Ap-markierte Duplex-ODN vollständig aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase verdrängt wird. Der Prozess ist somit irreversibel. Man erhält für  $k_{\text{off}}$  einen Wert in der Größenordnung von  $30 \text{ s}^{-1}$ .

Betrachtet man dagegen die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{off}}$  für die Verdrängung mit DamP18h, so findet man eine exponentielle Abhängigkeit. Dieses liegt daran, dass aufgrund der nahezu identischen  $k_d$ -Werte für die beiden Duplex-ODNs dieser Prozess reversibel ist. Der beobachtete  $k_{\text{off}}$ -Wert setzt sich in diesem Fall aus mehreren Geschwindigkeitskonstanten zusammen und zeigt bei geringen Dam DNA-MTase-Konzentrationen eine exponentielle Abnahme. Diese Konzentrationsabhängigkeit spiegelt sich auch in den jeweiligen Amplituden wieder. Mit zunehmender Menge an nicht markiertem Duplex-ODN nimmt die Amplitude zu und nähert

sich bei großen Konzentrationen einem Grenzwert. Dieses Verhalten zeigt, dass aufgrund der ähnlichen Bindung der Dam DNA-MTase sowohl zu unmarkierter DNA als auch zum Kompetitor, das Substrat durch den Kompetitor nicht vollständig aus dem Komplex verdrängt werden kann. Erst bei großem Überschuss an Kompetitor wird dieser Prozess irreversibel und der beobachtete  $k_{\text{off}}$ -Wert wird konzentrationsunabhängig.

Aus diesem Verdrängungsexperiment erhält man für  $k_{\text{off}}$  einen Wert von  $32,1 \pm 7,9 \text{ s}^{-1}$ , der sehr gut mit dem aus den Verdrängungsexperimenten mit DamP(A2delta)18h übereinstimmt. Unter der Annahme einer diffusionskontrollierten ersten Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA lässt sich folgendes Schema aufstellen:

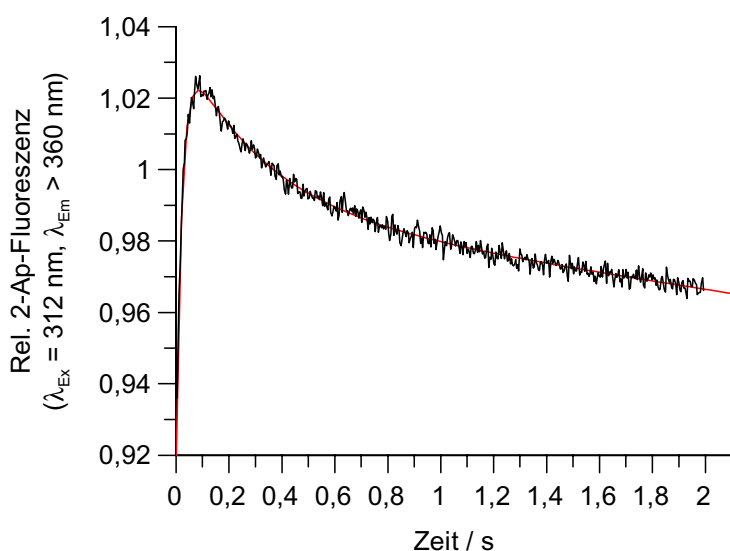


Somit ist es gelungen, die Bindung der Dam DNA-MTase an DNA in guter Näherung vollständig zu charakterisieren. Aus dem Schema geht hervor, dass die zuvor gemachte Annahme  $k_{+2} \ll k_{-1}$ , die zur Auswertung der Daten verwendet wurde, nicht ganz erfüllt ist. Vielmehr liegen beide Werte in der selben Größenordnung. Da der  $K_D$  mit 32 nM sich nicht wesentlich von dem Wert aus den direkten Titrations unterscheidet, wird dieses vernachlässigt und die Ergebnisse als Näherung angenommen.

Von großem Interesse ist es die Transientenkinetik in Gegenwart des Cofaktors zu betrachten. Dieses ist möglich, da in den direkten Titrations auch die Cofaktorbindung in Gegenwart von DNA beobachtet werden kann.

### 3.4.2 Kinetische Untersuchung der DNA-Bindung von der Dam DNA-MTase in Gegenwart des Cofaktors AdoMet

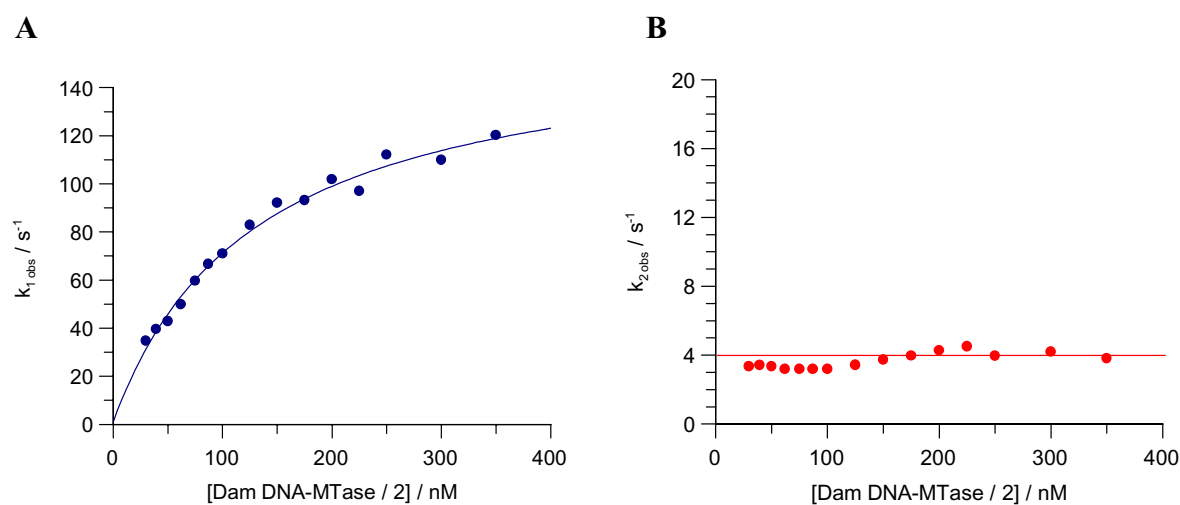
In den direkten Titrations des 2-Ap-haltigen Duplex-ODNs mit der Dam DNA-MTase in Gegenwart des Cofaktors AdoMet ist ein starker Einfluß des Cofaktors auf die 2-Ap-Fluoreszenz im Protein-DNA-Komplex beobachtet worden. Damit war es möglich nicht nur die DNA-Bindung in Gegenwart des Cofaktors zu untersuchen, sondern auch die Cofaktorbindung in Gegenwart von DNA zu charakterisieren. Nun stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit des Cofaktors einen Einfluß auf die Transientenkinetik der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase hat. Um dieses zu untersuchen, werden 2-Ap-markierte Duplex-ODN mit Überschußmengen an Dam DNA-MTase, die zuvor mit 10  $\mu\text{M}$  AdoMet vorinkubiert wurde, am Stopped-Flow-Gerät untersucht. In Abb. 30 ist als Beispiel die Assoziation von 100 nM Dam DNA-MTase, vorinkubiert mit 10  $\mu\text{M}$  AdoMet, an 20 nM DamP(A2Ap)18h dargestellt.



**Abb. 30:** Assoziation von 100 nM Dam DNA-MTase, vorinkubiert mit 10  $\mu\text{M}$  AdoMet, und 20 nM DamP(A2Ap)18h. Die Bindungskurve ist zweiphasig und wird doppelt-exponentiell ausgewertet.

Bei der Assoziation von mit AdoMet vorinkubierter Dam DNA-MTase an 2-Ap-haltiges Duplex-ODN sind in den Bindungskurven deutlich zwei Phasen zu erkennen. Die erste Phase ist sehr schnell und die 2-Ap-Fluoreszenz nimmt zu. Dagegen ist die zweite Phase wesentlich langsamer und geht mit einer Abnahme der 2-Ap-Fluoreszenz einher. Im Vergleich dazu tritt bei vergleichbaren Experimenten jedoch ohne AdoMet nur eine sehr schnelle Phase auf. Diese Tatsache und die Tatsache, dass es sich bei der zweiten Phase um eine Signalabnahme

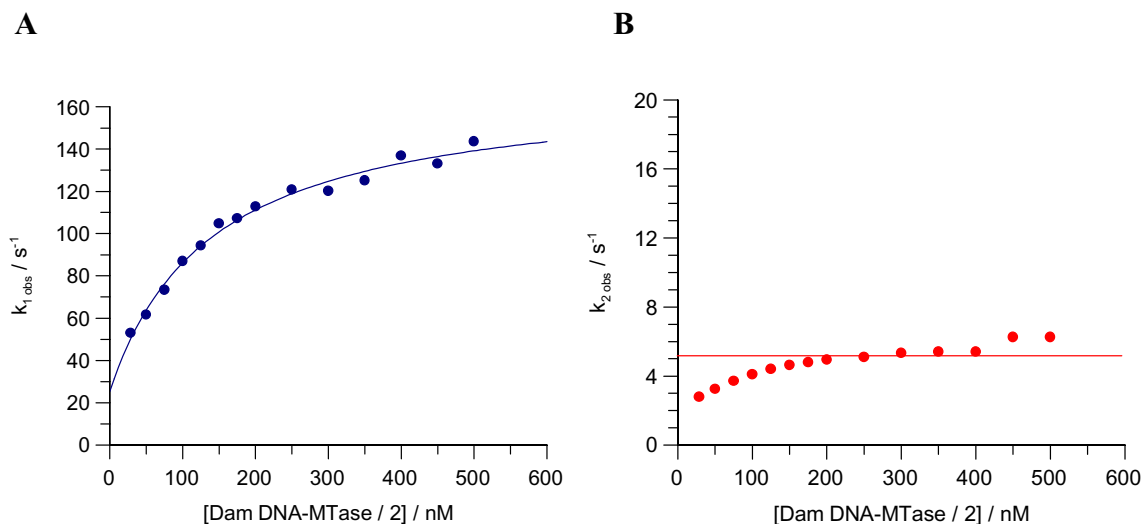
handelt, läßt darauf schließen, dass die erste Phase in diesem Experiment mit der Phase bei den Messungen ohne Cofaktor identisch ist. Die zweite Phase wird folglich von der Anwesenheit des Cofaktors bestimmt. Die Assoziationsgeschwindigkeit der Dam DNA-MTase an DNA in Gegenwart von AdoMet wird in Abhängigkeit von der Dam DNA-MTase-Konzentration gemessen. In Abb. 31 sind die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{1\text{obs}}$  und  $k_{2\text{obs}}$  gegen die Dam DNA-MTase Konzentration aufgetragen.



**Abb. 31:** Auftragung der beobachteten ersten (A) und zweiten (B) Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von, mit 10  $\mu\text{M}$  AdoMet vorinkubierter, Dam DNA-MTase an DNA gegen die Dam DNA-MTase-Konzentration. Die erste Phase kann hyperbolisch ausgewertet werden, wogegen die zweite Phase konzentrationsunabhängig ist.

In Abb. 31 A erkennt man, dass diese beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{1\text{obs}}$  der beobachteten Geschwindigkeitskonstante aus den Experimenten in Abwesenheit von AdoMet entspricht. In den Experimenten, bei denen die Dam DNA-MTase zunächst mit AdoMet vorinkubiert wurde, kann die Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{1\text{obs}}$  wie auch ohne Vorinkubation mit AdoMet mit einer hyperbolischen Funktion beschrieben werden. Die daraus erhaltenen Konstanten unterscheiden sich mit  $K_{d1} = 130 \pm 31 \text{ nM}$  und  $k_{+2} = 161 \pm 6 \text{ s}^{-1}$  nicht wesentlich von den Ergebnissen ohne AdoMet. Auf die Assoziation der Dam DNA-MTase an die DNA folgt das Herausklappen des 2-Ap-Rests und in Gegenwart von Cofaktor schließt sich ein dritter Schritt an. Dieser dritte Schritt ist von der Dam DNA-MTase-Konzentration unabhängig und hat einen Wert von  $4 \text{ s}^{-1}$  (Abb. 31 B). Bei diesem dritten Schritt handelt es sich wahrscheinlich um eine AdoMet-abhängige Konformationsänderung

des Enzyms, die zu einer Abnahme der Fluoreszenz des herausgeklappten 2-Ap-Rests führt. Dieses Experiment wird mit einem noch größeren Überschuß an AdoMet wiederholt, um zu überprüfen, ob die Menge an Cofaktor einen Einfluß auf die Reaktion hat. Es werden Lösungen von 20 nM 2-Ap-markiertem Duplex-ODN mit Überschußmengen an Dam DNA-MTase, die zuvor mit 50  $\mu\text{M}$  AdoMet vorinkubiert wurde, am Stopped-Flow-Gerät untersucht. Bei den einzelnen Messungen sind erneut zwei Phasen zu beobachten, die in Abb. 32 in Abhängigkeit von der Dam DNA-MTase Konzentration dargestellt sind.



**Abb. 32:** Auftragung der beobachteten ersten (A) und zweiten (B) Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von mit 50  $\mu\text{M}$  AdoMet vorinkubierter Dam DNA-MTase an DNA gegen die Dam DNA-MTase-Konzentration. Die erste Phase kann hyperbolisch ausgewertet werden, wogegen die zweite Phase auch in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  AdoMet relativ unabhängig von der Dam DNA-MTase Konzentration zu sein scheint.

In Abb. 32 A ist die Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{1, \text{obs}}$  in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  AdoMet dargestellt. Sie kann mit einer hyperbolischen Funktion beschrieben werden. Die daraus erhaltenen Konstanten unterscheiden sich mit  $K_{d1} = 140 \pm 27 \text{ nM}$  und  $k_{+2} = 146 \pm 5 \text{ s}^{-1}$  nicht wesentlich von den Ergebnissen ohne AdoMet. Auch  $k_{-2}$  mit  $25 \pm 7 \text{ s}^{-1}$  ist in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  AdoMet erneut in der Größenordnung wie bei den Experimenten ohne AdoMet.

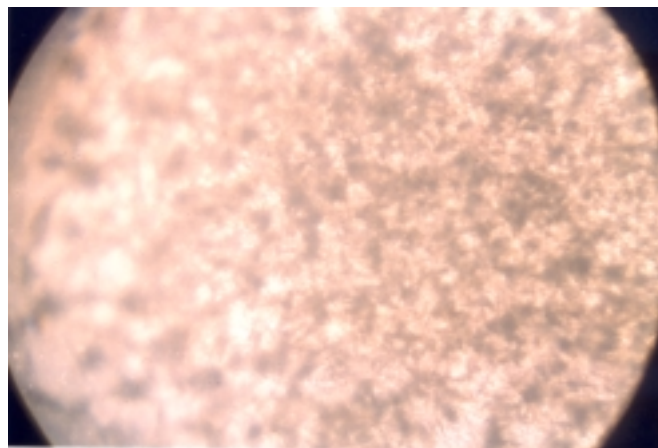
Betrachtet man die Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{2, \text{obs}}$ , so ist keine eindeutige lineare Abhängigkeit wie in Abb. 31 B erkennbar. Ein möglicher hyperbolischer Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  AdoMet scheint denkbar, ist jedoch nicht sehr ausgeprägt. Somit wird dieser vernachlässigt und es wird angenommen, dass eine Erhöhung der AdoMet-Konzentration keinen weiteren Einfluß auf die Kinetik der DNA-Bindung hat.

### 3.5 Kristallisation der Dam DNA-MTase

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann mit röntgenkristallographischen Methoden bei atomarer Auflösung bestimmt werden. Dabei erhält man ein Strukturmodell mit den Positionen der einzelnen Atome. Neben der Kenntnis der Faltung der Polypeptidkette ermöglicht die Untersuchung einer Proteinstruktur auch das Verständnis der Proteinfunktion auf molekularer Ebene, z.B. den katalytischen Mechanismus eines Enzyms oder die spezifische Interaktion eines Rezeptors mit seinem Liganden. Prinzipiell können biologische Makromoleküle jeder Art und Größe mit kristallographischen Methoden untersucht werden, vorausgesetzt es gelingt, diese zu kristallisieren.

Obwohl es eine große Fülle von verschiedenen DNA-MTasen gibt, ist es erst bei drei DNA-MTasen gelungen, deren Struktur im Komplex mit DNA zu bestimmen. Dazu gehören die beiden C5-Cytosin DNA-MTasen *M·HhaI* (Klimasausakas *et al.*, 1994) und *M·HaeIII* (Reinisch *et al.*, 1995) sowie die N6-Adenin DNA MTase *M·TaqI* (Goedecke *et al.*, 2001). Ohne DNA sind bislang erst vier Strukturen von den N-DNA-MTasen bekannt. Dazu gehören die DNA-MTasen *M·TaqI* (Labahn *et al.*, 1994), *M·PvuII* (Gong *et al.*, 1997), *M·RsrI* (Scavetta *et al.*, 2000) und die DpnM (Tran *et al.*, 1998). Aufgrund der Tatsache, dass die Dam DNA-MTase alleinständig ist und insbesondere der Beobachtung, dass sie als Dimer an DNA bindet, sind im Rahmen dieser Arbeit Kristallisationsexperimente durchgeführt worden. Die Herstellung von qualitativ hochwertigen Kristallen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Strukturbestimmung. In Anlehnung an die Kristallisationsbedingungen von *M·TaqI* und aus der Tatsache heraus, dass die Dam DNA-MTase in Abwesenheit von DNA sehr instabil ist, sind erste Ansätze in Gegenwart von DNA durchgeführt worden. Dabei stellte sich heraus, dass die Länge der verwendeten DNA entscheidend für eine Kristallisation ist. Die Länge der eingesetzten Duplex-ODN, die alle mittig die Dam DNA-MTase Erkennungssequenz 5'-GATC-3' enthielten, variierte zwischen zehn und 13 Basenpaaren. Aufgrund der Erfahrungen mit *M·TaqI* bezüglich des Methylierungsgrades der DNA wurde ausschließlich hemimethylierte DNA verwendet. Für die Kristallisation wurde die Methode des hängenden Tropfens gewählt. Dabei wird ein kleines Volumen (2 µl) einer konzentrierten Lösung von Fällungsmittel und Puffer auf ein kleines Deckglas pipettiert. Anschließend wird das gleiche Volumen Proteinlösung, die sich aus der Dam DNA-MTase und der DNA zusammensetzt, hinzugefügt. Das Deckglas wird umgedreht, auf einer Zellkulturplatte über einer Vertiefung aufgesetzt und durch einen Film von Silikonfett abgedichtet, wodurch sich

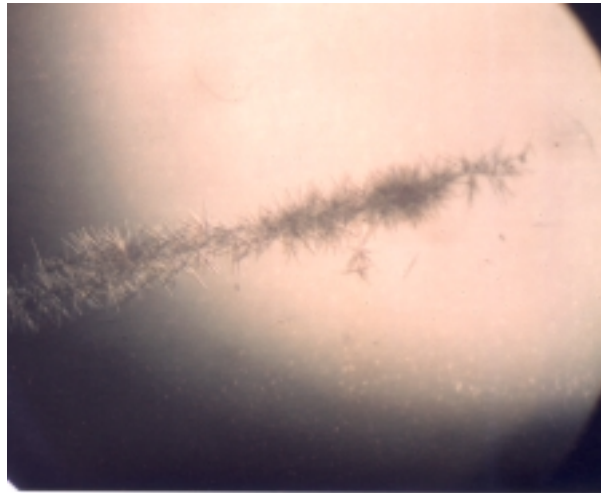
der Tropfen in einem abgeschlossenen System befindet. In die Vertiefungen wurde zuvor 1 ml der unverdünnten Lösung von Fällungsmittel und Puffer gegeben. Da in dem hängenden Tropfen die Fällungsmittelkonzentration nur halb so groß ist wie im Reservoir, verringert sich das Volumen des Tropfens durch Dampfdiffusion von Wasser. Dadurch erhöhen sich langsam die Konzentrationen im Tropfen, bis eine Übersättigung und unter Umständen Kristallisation des Proteins eintritt. In den ersten Ansätzen sind kommerziell erhältliche Lösungen für die Kristallisation zum Einsatz gekommen und innerhalb von drei Tagen sind erste Kristallbüschel gewachsen. Diese konnten nur mit dem 12 Basenpaare-langen Duplex-ODN DamP12h erhalten werden. In Abb. 33 sind die ersten erhaltenen Kristallbüschel abgebildet.



**Abb. 33:** Erste erhaltene Kristallbüschel der Dam DNA-MTase in Gegenwart von DamP12h.

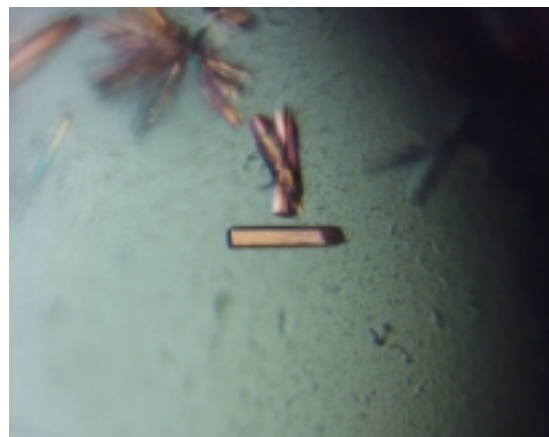
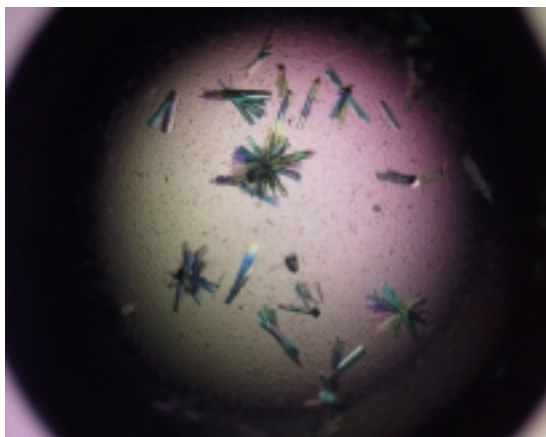
Die Bedingungen aus denen die ersten Kristallbüschel gewachsen sind, wurden anschließend durch Variation des pH-Wertes, der PEG Konzentration und des PEG Molekulargewichtes verbessert, so dass größere Kristalle erhalten wurden. Durch Animpfen der neu erstellten Tropfen mit Keimen von vorher gewachsenen Kristallen mit Hilfe eines Katzenhaares konnte das Kristallwachstum beeinflusst werden. Bei dieser Methode wuchsen die Kristalle sehr dicht entlang der Keimlinie und konnten somit nicht verwendet werden. In Abb. 34 ist ein mit Katzenhaar angeimpfter Tropfen abgebildet.





**Abb. 34:** Kristallisation der Dam DNA-MTase in Gegenwart von DamP12h nach Animpfen mit Hilfe eines Katzenhaares.

Ansätze mit kommerziell erhältlichen Additiven oder in Gegenwart von SAH oder 5'-AETA führten zu keiner Verbesserung der Kristallqualität. Gute Kristalle wurden erst durch das so genannte *Makro seeding* erhalten. Dabei werden einzelne kleine Kristalle in einen frisch angesetzten Tropfen überführt. Diese Kristalle wachsen dann im neuen Tropfen weiter und dienen gleichzeitig als Kristallisationskeime für neue Kristalle. In Abb. 35 sind Beispiele abgebildet.



**Abb. 35:** Kristalle der Dam DNA-MTase in Gegenwart von DamP12h nach *Makro seeding*.

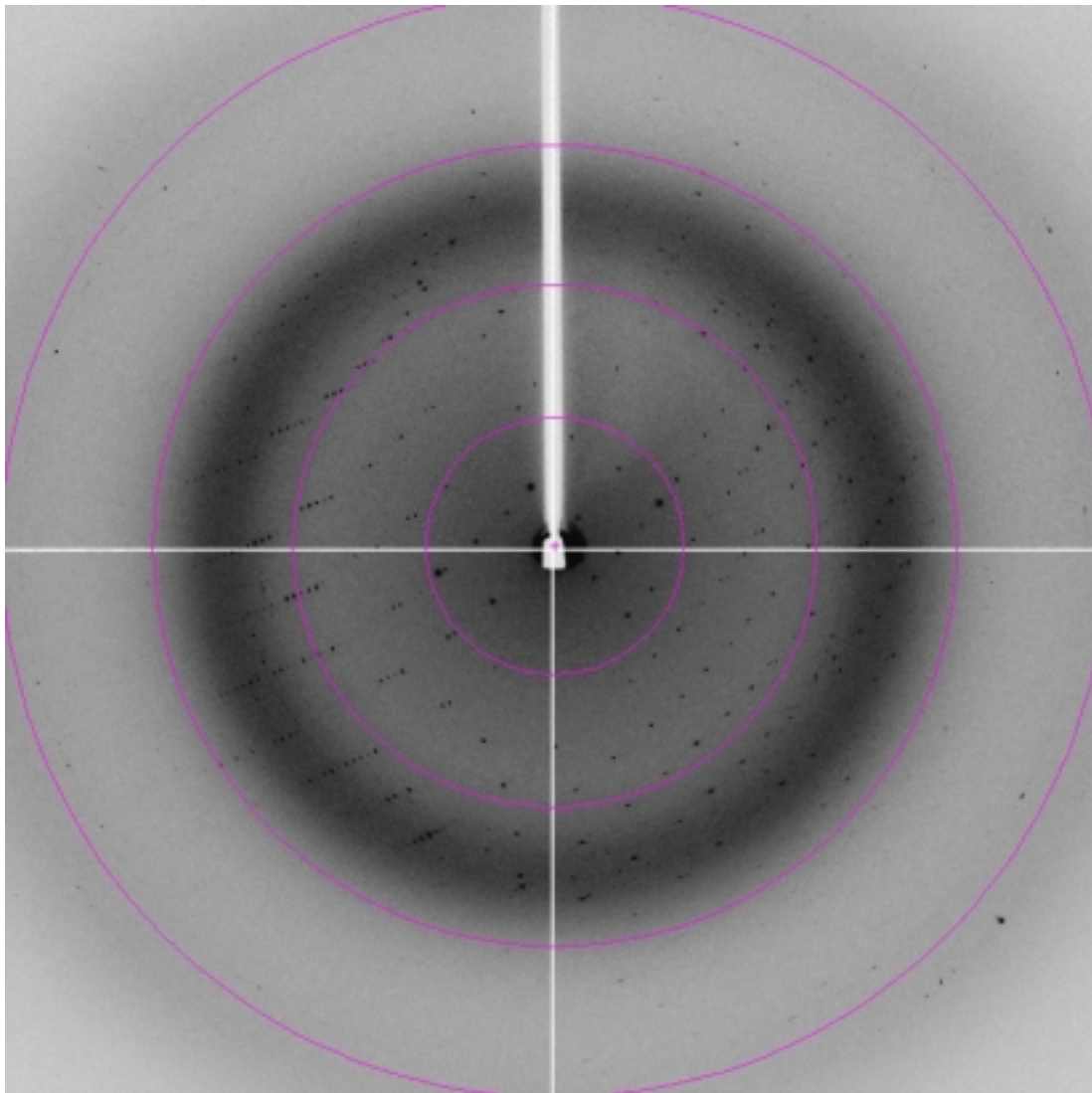
Die besten Kristalle, die erhalten wurden, hatten eine Größe von  $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  und wurden zur Datensammlung verwendet.

### 3.5.1 Datensammlung

Für eine erste Qualitätseinschätzung der Kristalle wurden diese im Haus vorgetestet. Die Datensammlung erfolgte mit Hilfe einer rotierenden Kupferanode an einem Phosphor-Bildplatten-Detektor bei 100 K. Ein kompletter Datensatz der gut streuenden Einkristalle wurden anschließend am europäischen Elektronensynchrotron (ESRF) in Grenoble, Frankreich, aufgenommen. Ein Diffraktionsbild ist exemplarisch in Abb. 36 wiedergegeben. Während die Kristalle im Haus maximal bis 3.0 Å Bragg-Abstand streuten, konnte mit Hilfe der hochbrillianten Synchrotronstrahlung des ESRF Röntgendaten bis 2.1 Å Auflösung gemessen werden. Die Kristalle wachsen in einer orthorhombischen Raumgruppe (alle Winkel 90°) mit einem Molekül Dam DNA-MTase pro asymmetrischer Einheit (basierend auf einem Mathews-Parameter von 2.3 Å<sup>3</sup> / Da) und Elementarzellkonstanten von  $a = 35,7 \pm 0,1$  Å,  $b = 63,4 \pm 0,1$  Å und  $c = 147,2 \pm 0,2$  Å.

### 3.5.2 Das Phasenproblem

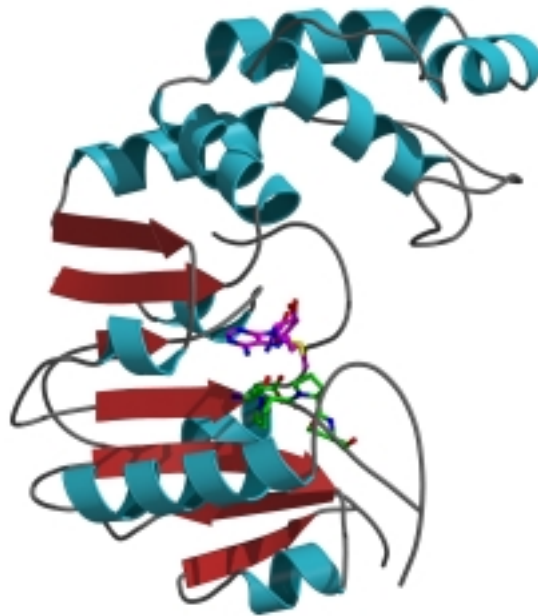
Die an einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen enthalten die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome in dem Kristall. Diese Information ist in der Amplitude und der Phase der gebeugten elektromagnetischen Welle enthalten. Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert und ist somit bekannt. Werden die gebeugten Röntgenstrahlen detektiert, so kann die Amplitude durch die relative Intensität gemessen werden. Eine Messung der Phase ist prinzipiell nicht möglich, wodurch ein entscheidender Teil der notwendigen Information für die Berechnung der Elektronendichte im Kristall verlorenght. Da die Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome gestreut werden, ergibt die Röntgenstrukturanalyse nicht sofort die exakten Atomkoordinaten wieder, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichte bezeichnet wird. Die Elektronendichte an jedem Punkt im Kristall läßt sich aus der Strukturfaktoramplitude, der dazugehörigen Phase und den Dimensionen der Elementarzelle berechnen. Für die Bestimmung der Molekülstruktur sind demnach beide Werte, die Amplitude und die Phase erforderlich.



**Abb. 36:** Rotations-Diffraktionsbild eines Kristalles der Dam DNA-MTase in Komplex mit DNA. Die Aufnahme dieser Röntgendiffraktionsdaten erfolgte an der Mess-Station ID14-2 (Röntgenwellenlänge 0,934 Å) am ESRF in Grenoble. Der Oszillationswinkel der Aufnahme betrug 1,0°, die Daten wurden mit Hilfe eines ADSC Q4 CCD-Detektors bei 100 K aufgenommen. Die einzelnen Kreise kennzeichnen die Auflösungsgrenzen 8,7 Å, 4,4 Å, 2,8 Å und 2,2 Å (von innen nach außen). Die äußeren Reflexe sind innerhalb der dargestellten Kontour mit dem Auge nicht mehr zu sehen, konnten aber von der Software bis 2,1 Å erkannt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die fehlenden Phaseninformationen zu erhalten. Eine davon ist der *molekulare Ersatz* (MR), falls bereits ein dreidimensionales Strukturmodell vorhanden ist. Der Einsatz des MR reicht von sehr einfachen Problemen, wie die Untersuchung einer neuen Kristallform einer bereits aufgeklärten Proteinstruktur oder die Analyse von Mutanten eines Proteins mit bekannter Struktur bis hin zu Proteinen, die nur eine gewisse Sequenzidentität zu einem Protein mit bereits bekannter Struktur zeigen. Aus den Koordinaten der bekannten Proteinstruktur können die Strukturfaktoramplituden und die Phasen für das Modell berechnet werden. Mit den Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden wird eine Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur erhalten. Normalerweise unterscheiden sich sowohl die Raumgruppen als auch die Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und der neuen Struktur. Daher muß das bekannte Strukturmodell erst korrekt in der neuen Kristallzelle plaziert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem wird in zwei Schritte aufgeteilt. Zuerst wird die Rotationsorientierung mit Hilfe einer Patterson-Funktion ermittelt. Dabei werden zwei Patterson-Funktionen berechnet, die eine mit den Strukturfaktoramplituden aus den gemessenen Beugungsintensitäten, die andere mit den Strukturfaktoramplituden, die aus den Atomkoordinaten des Suchmodells berechnet werden. Die zwei Sätze von Patterson-Vektoren werden dann durch eine Produktfunktion miteinander korreliert, wobei der eine Vektorensatz gegen den anderen in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gedreht wird. Bei einer guten Übereinstimmung gibt die daraus erhaltene Rotationsfunktion einen hohen Wert, der eine mögliche Rotationslösung anzeigt. Anschließend wird das rotierte Suchmodell entsprechend in alle drei Raumrichtungen translatiert und eine sogenannte Translationsfunktion optimiert, wobei nach jedem Schritt eine Korrelation zu den experimentellen Strukturfaktoramplituden berechnet wird. Nachdem das Suchmodell in der neuen Kristallzelle plaziert wurde, kann eine Elektronendichte berechnet und mit der Korrektur und Verfeinerung der Struktur begonnen werden.

Die Methode des *molekularen Ersatzes* wurde auch für den Datensatz der mit der Dam DNA-MTase erhaltenen Kristalle eingesetzt. Als Modellstruktur wurde die kürzlich gelöste Kristallstruktur der DpnM DNA-Adenin-Methyltransferase aus dem *DpnII* Restriktions-Modifikations-System von *Streptococcus pneumoniae* (Tran *et al.*, 1998) verwendet. Wie die Dam DNA-MTase gehört auch die DpnM DNA-MTase zur  $\alpha$ -Gruppe der DNA-MTasen (Malone *et al.*, 1995). In Abb. 37 ist die Struktur abgebildet.



**Abb. 37:** Kristallstruktur der DpnM DNA-MTase im Komplex mit Cofaktor AdoMet (magenta). Hervorgehoben ist das konservierte Motiv DPPY (grün).

Das Protein besitzt eine C-förmige Struktur. Es ist aus einer großen Domäne, zu der die Aminosäurereste 10 - 76 und 169 - 284 zählen und einer kleinen Domäne mit den Aminosäureresten 77 - 168 aufgebaut. Die große Domäne, die etwa 2/3 des gesamten Proteins ausmacht, besteht aus sieben  $\beta$ -Faltblättern, die von  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Außer im siebten Faltblatt gehen allen anderen  $\beta$ -Faltblättern  $\alpha$ -Helices voraus, die parallel zu diesen orientiert sind. Diese Domäne bindet auch den Cofaktor AdoMet. Er wird in einer Tasche an der Oberfläche des Enzyms gebunden. In die Furche, die durch die beiden Domänen gebildet wird, würde die DNA hineinpassen. Doch ist bislang die Struktur in Gegenwart von DNA nicht aufgeklärt, so dass dieses nur eine Modellvorstellung ist.

Der molekulare Ersatz wurde mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) aus dem CCP4 Programmpaket (CCP4, 1994) durchgeführt. Doch ist es nicht gelungen mit der DpnM DNA-MTase die Phasierung erfolgreich abzuschließen. Ein Grund dafür könnte in der geringen Aminosäuresequenzidentität zwischen der DpnM und der Dam DNA-MTase von 27 % liegen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der fehlenden Phaseninformation ist die Methode des *isomorphen Ersatzes*. Hierbei werden die Proteinkristalle in Lösungen von Salzen oder

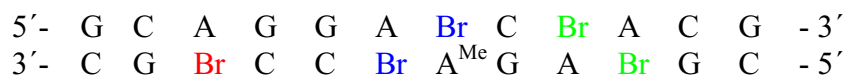
Verbindungen transferiert, die ein Atom oder Ion mit hoher Massenzahl enthalten. Die Schweratomverbindungen diffundieren in den Kristall und binden an das Protein. Je nach den chemischen Eigenschaften des Metallions oder der Metallverbindung bilden sie mit dem Protein eine kovalente Bindung, z.B.  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen mit der Thiolgruppe eines Cysteinrestes oder eine koordinative Bindung wie  $[\text{PtCl}_4]^{2-}$  mit der Seitenkette eines Histidinrestes. Durch ihre größere Zahl an Elektronen beugen die Schweratome Röntgenstrahlen viel stärker als die in den Aminosäuren enthaltenen Atome. Für diese Methode ist es wichtig, dass das Schweratom keine Veränderung an der Proteinstruktur oder der Packung der Proteinmoleküle im Kristall bewirkt. Das heißt, dass der Schweratom-modifizierte Kristall isomorph zu dem nativen Kristall sein muß. Die Reflexe eines isomorphen Derivatkristalls liegen somit an identischen Positionen auf sich entsprechenden Beugungsaufnahmen, die relativen Intensitäten unterscheiden sich aber. Durch die Intensitätsunterschiede der Reflexe zwischen dem nativen und dem isomorphen Derivatkristall kann die Position der Schweratome in der Kristallzelle berechnet werden. Hierzu wird ebenfalls eine Patterson-Funktion verwendet. Diese stellt einen Satz von Vektoren dar, deren Beträge und Richtungen den Abständen und Orientierungen zwischen den Atomen in der Kristallzelle entsprechen. Dabei haben alle Vektoren ihren Anfangspunkt im Koordinatenursprung. Die Patterson-Funktion wird mit den Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden von nativen und derivatisierten Kristallen berechnet, das heißt man erhält die Vektoren, die den Abständen und den relativen Orientierungen zwischen den Schweratomen entsprechen. Es wird somit zuerst die Lage des an das Protein gebundenen Schweratoms im Kristall bestimmt. Die durch diese Schweratomposition erhaltene Phaseninformation erlaubt eine grobe Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur. Um eine bessere Bestimmung zu erhalten, werden unterschiedliche Metallverbindungen der Reihe nach getestet und somit auch eine Bindung an verschiedenen Stellen des Proteins erreicht. Die Kombination der Phaseninformation der verschiedenen Derivatkristalle wird daher *multiple isomorphous replacement* (MIR) genannt.

Eine dritte Methode zur Bestimmung von Proteinkristallstrukturen beruht auf der anomalen Streuung von Röntgenstrahlen. Normalerweise sind die Intensitäten der zwei Reflexe, die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind identisch. Die Anwesenheit bestimmter Atome im Kristall kann jedoch dazu führen, dass sich die Intensitäten unterscheiden. Dieses wird als anomale Dispersion bezeichnet. Die Größe dieser Intensitätsunterschiede hängt zum einen von dem Atom ab, das für die anomale Dispersion verantwortlich ist, und zum anderen von der Wellenlänge des Röntgenstrahls. Bei den in den Aminosäuren enthaltenen Atomen ist der Effekt der anomalen Dispersion sehr gering und

kann meßtechnisch kaum erfasst werden. Anders verhält sich dies bei vielen Schwermetallen, die zur MIR-Phasenbestimmung an das Protein gebunden werden. Liegt eine Röntgenabsorptionskante des Metalls in der Nähe der Wellenlänge des Röntgenstrahls, kommt es zur Mitwirkung der inneren Elektronen am Streuvorgang und so zur anomalen Dispersion durch eine Phasenverschiebung. Aus den auftretenden Intensitätsunterschieden läßt sich die Position des anomalen Streuers und daraus die Phaseninformation ableiten. Bei einem MAD-Experiment (*multiple wavelength anomalous dispersion*) werden bei drei verschiedenen Wellenlängen jeweils komplette Datensätze von einem Kristall gesammelt. Bei der Wellenlänge direkt am Absorptionsmaximum wird ein starkes anomales Signal gemessen, bei einer Wellenlänge knapp neben dem Absorptionsmaximum wird ein Datensatz erhalten, der isomorphe Differenzen zu dem dritten Datensatz ergibt. Dieser dritte Datensatz ist der native Datensatz, der bei einer Wellenlänge ohne signifikanter anomaler Beugung aufgenommen wird. Die Kombination der anomalen und isomorphen Phasen aus einem erfolgreichen MAD-Experiment führt meist zu einer interpretierbaren Elektronendichte.

Damit entweder MIR- oder MAD-Experimente mit der Dam DNA-MTase zur Lösung des Phasenproblems durchgeführt werden können, müssen Kristalle gezüchtet werden die zusätzlich weitere Atome enthalten als der native Datensatz. Da die Kristallisation in Gegenwart von DNA durchgeführt wurde, lag es Nahe über die DNA zusätzliche Atome in den Kristall einzuführen. Dafür wurde jeder Thyminrest innerhalb des doppelsträngigen 12 Basenpaare langen Duplex-ODNs gegen 5-Ioduracil ausgetauscht. Da im ersten Strang zwei, im Gegenstrang drei 5-Ioduracilnukleotide eingebaut wurden, konnten insgesamt drei unterschiedliche Duplex-ODN, nämlich mit zwei, drei oder fünf Iodatomen nach Hybridisierung erhalten werden. Jedoch zeigte die Dam DNA-MTase in Gegenwart von 5-Ioduracil-haltiger DNA ein sehr viel schlechteres Kristallisationsverhalten als in Gegenwart von nativer DNA. Es wurde mit diesen Kristallen kein eindeutiges Signal und nur ein Datensatz mit niedriger Auflösung und schlechter Statistik erhalten. Zudem tauchte das Problem auf, dass durch die Tatsache das kein hemimethylierter Gegenstrang für die Kristallisation verwendet wurde, der Dam DNA-MTase keine Richtung der DNA-Bindung vorgegeben wurde. Dieses mögliche Problem wurde bei vergleichbaren Ansätzen, bei denen jeder Thyminrest innerhalb der doppelsträngigen DNA gegen 5-Bromuracil ausgetauscht wurde, beachtet. Es wurden folglich Ansätze in Gegenwart von doppeltmodifizierter DNA durchgeführt. Die erste Modifikation beinhaltet das Einbringen von 5-Bromuracil und die zweite Modifikation die Verwendung von N6-Methyladenin im Gegenstrang. Doch auch der

Komplex aus Dam DNA-MTase und hemimethylierter DNA, die insgesamt fünf Br-Atome enthielt, kristallisierte wesentlich schlechter als der native Komplex. Es ist jedoch gelungen ein anomales Signal zu messen. Bei einem Fluoreszenzscan konnte auch gezeigt werden, dass Br in dem Kristall enthalten war, doch hat das Signal nicht ausgereicht, um die Br-Atome zu lokalisieren. Bei diesem Kristall sind  $360^\circ$  gemessen worden, dennoch besaß er bei einer Auflösung von  $3,2 \text{ \AA}$  eine zu schlechte Statistik, um weiter ausgewertet werden zu können. Betrachtet man die Sequenz der verwendeten DNA und schaut sich den Abstand zwischen den einzelnen Br-Atomen innerhalb dieser an, so stellt man fest, dass jeweils zwei Paare (blau und grün dargestellt) räumlich nah zueinander sind und möglicherweise aufgrund der niedrigen Auflösung nur jeweils ein Signal ergeben.



Ein weiteres Problem, das besonders bei dem verwendeten 5-Ioduracil aber auch bei dem 5-Bromuracil auftreten kann, ist eine durch die Bestrahlung des Kristalls induzierte Abspaltung des Iod- bzw. Br-Atoms. Dieser Effekt wird durch zunehmende Bestrahlungszeit und Intensität verstärkt. Dadurch ist das jeweilige Atom nicht mehr kovalent gebunden und kann infolge dessen nicht lokalisiert vorliegen.

Es wurde auch versucht die MAD-Methode durch Einbau von Seleno-Methionin in die Dam DNA-MTase durchzuführen. Doch scheiterte dieses Experiment an der Expression der Seleno-Methionin-modifizierten Dam DNA-MTase. Die Zellanzucht und Expression der Dam DNA-MTase in Gegenwart von Seleno-Methionin-haltigem Medium war sehr schlecht und lieferte keine zufriedenstellend saubere modifizierte Dam DNA-MTase. Außerdem war die erhaltene Menge an Protein zu gering, um damit Kristallisationsansätze durchführen zu können.

Somit blieb nur die Möglichkeit native Kristalle mit Schwermetallsalz-Lösungen zu tränken. Doch konnten mit dieser Methode bislang keine Kristalle erhalten werden, die einen geeigneten Datensatz liefern.

Das größte Problem bei der Kristallisation der Dam DNA-MTase besteht darin, ausreichend große und einzelne Kristalle herzustellen. Insgesamt sind rund 95 % aller Kristalle in irgendeiner Form miteinander verwachsen. Am häufigsten treten ganze Kristallbüschel auf. Aus den bisherigen Daten geht hervor, dass der Kristall eine zweizählige Achse hat. Wahrscheinlich liegt diese zwischen den beiden DNA-Strängen. Doch genau darin liegt das Problem. Da die DNA nicht palindromisch ist, muß es zwangsläufig zu einem



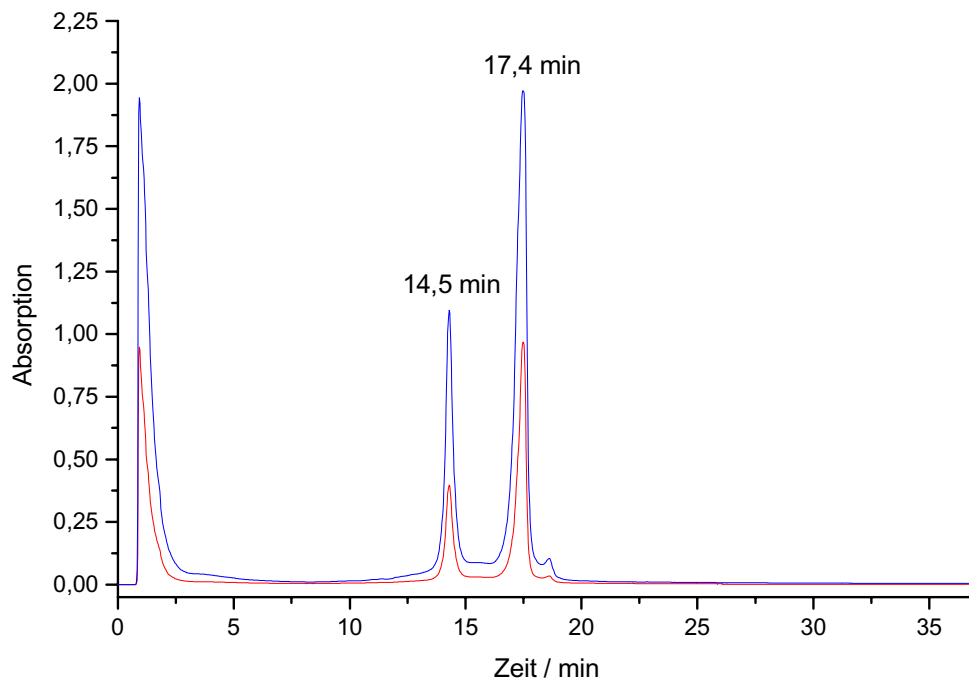
---

Symmetriebruch kommen. Wahrscheinlich liegt jeweils ein DNA-Strang mit der daran gebundenen Dam DNA-MTase in einer Einheitszelle und der Gegenstrang mit der daran gebundenen Dam DNA-MTase in einer anderen Einheitszelle, die jedoch aufgrund der DNA nicht identisch sein kann. Somit ist auch keine Raumgruppensicherheit gegeben und die Phasierung der Daten wird zusätzlich erschwert.

### 3.6 Charakterisierung der DNA-Bindungsstelle der Dam DNA-MTase

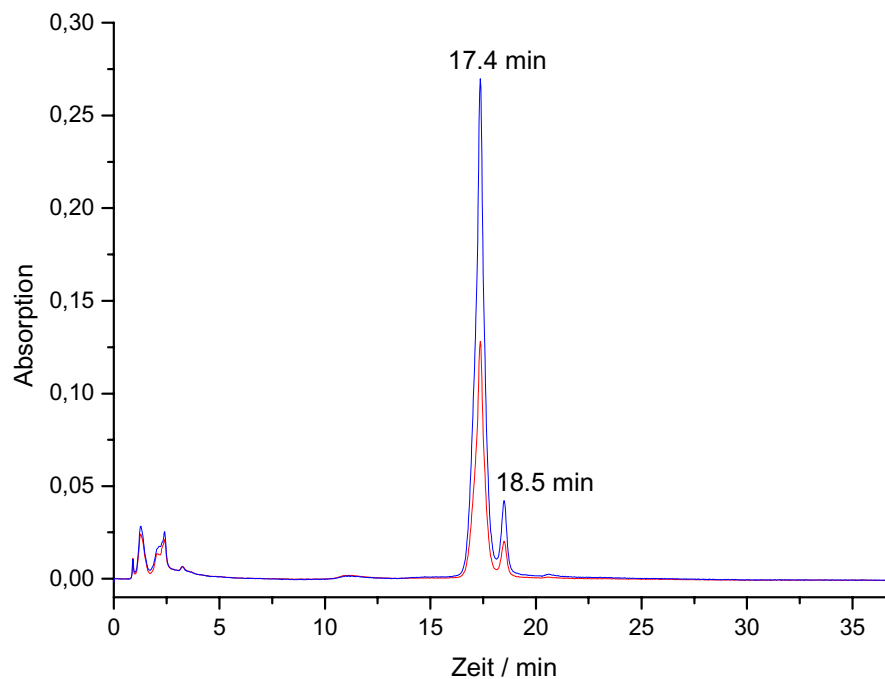
Da es bislang noch nicht gelungen ist die Kristallstruktur der Dam DNA-MTase zu bestimmen, wird die *Photocrosslinking*-Reaktion mit 5-Ioduracil-haltigem Duplex-ODN benutzt, um Auskunft über Aminosäurereste zu erhalten, die an der Wechselwirkung mit der extrahelikalen Zielbase beteiligt sind. Diese Methode ist schon mehrfach zum Erwerb von Informationen über Protein-DNA Wechselwirkung verwendet worden. Beispielsweise wurde mittels der *Photocrosslinking*-Reaktion der an der DNA-Bindung beteiligte Aminosäurerest bei der Endonuklease *PI-SceI* (Pingoud *et al.*, 1999) und der Restriktionsendonuklease *SsoII* (Kubareva *et al.*, 2000) charakterisiert. Auch für DNA-MTasen wie *M-EcoRI* (Wong *et al.*, 2000) und *M-CviBIII* (Holz *et al.*, 1999a) ist diese Methode angewandt worden.

Für die *Photocrosslinking*-Reaktion wird Dam DNA-MTase in Gegenwart von DamP(A2I)18 und AdoMet mit einer Hg-Dampflampe bestrahlt. Bei dieser Reaktion wird auf die Synthese eines hemimethylierten Duplex-ODNs verzichtet und statt dessen die Methylierungseigenschaften der DNA-MTase ausgenutzt. Nach 70 min Bestrahlung wird die Reaktion beendet und das *Crosslinking*-Produkt mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. In Abb. 38 ist ein Chromatogramm der Reinigung des Komplexes aus Dam DNA-MTase und DNA dargestellt. Die Ausbeute an Protein-DNA-Komplex lag bei lediglich 29 %, was auf die geringe Leistung der für die Bestrahlung verwendeten Hg-Dampflampe zurückzuführen ist.



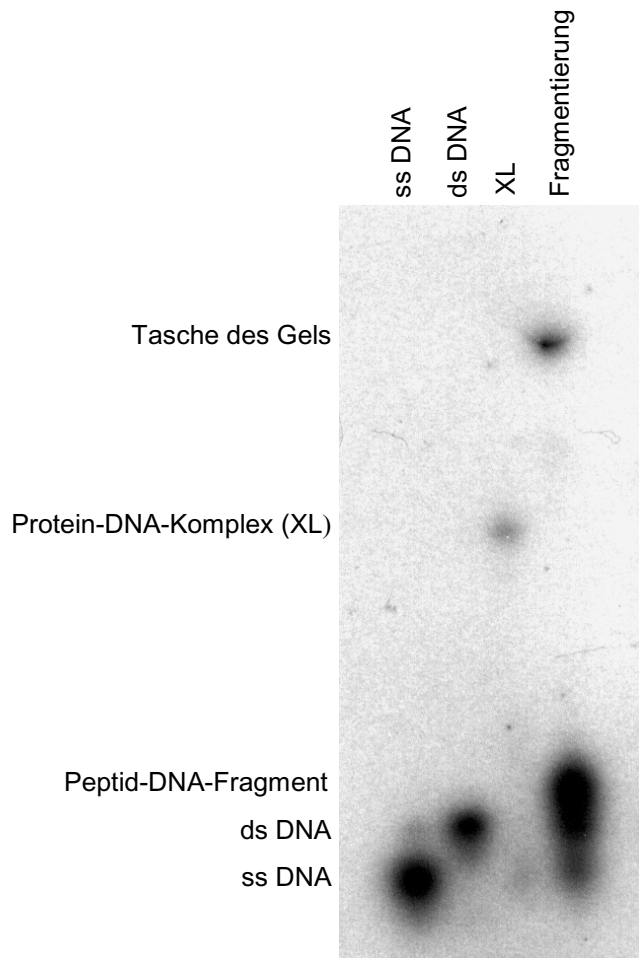
**Abb. 38:** Chromatogramm der Reinigung der *Crosslinking*-Reaktion von Dam DNA-MTase mit DamP(A2I)18. In blau ist die Absorption bei 260 nm und in rot die Absorption bei 280 nm dargestellt. Der Komplex eluiert aufgrund der stärkeren Abschirmung der negativen Ladung der DNA durch das Protein bei geringerem Salzgehalt (14,5 min) als die freie DNA (17,4 min).

Im Anschluß an die Aufreinigung und Entsalzung wird der Protein-DNA-Komplex proteolytisch fragmentiert. In früheren Arbeiten mit M-CviBIII (Holz *et al.*, 1999a) konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin 122 innerhalb der Peptidsequenz NPPY des konservierten Motivs IV die kovalente Bindung zur DNA ausbildet. Da auch die Dam DNA-MTase dieses konservierte Motiv mit der Peptidsequenz DPPY enthält, war anzunehmen, dass auch hier der Tyrosinrest an der DNA-Bindung beteiligt ist. Um ein möglichst kleines Peptidfragment nach der proteolytischen Fragmentierung zu erhalten, wurde deshalb eine zweifache Fragmentierung des gereinigten Komplexes durchgeführt. Dieser wurde zunächst über Nacht bei Raumtemperatur mit 1/20-Gewichtsanteilen an Trypsin inkubiert und anschließend mit der entsprechenden Menge an Chymotrypsin innerhalb von 4,5 h bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde das Peptid-DNA-Fragment erneut mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Das Chromatogramm ist in Abb. 39 dargestellt.



**Abb. 39:** Chromatogramm des mit Trypsin und Chymotrypsin fragmentierten, kovalenten Komplexes aus Dam DNA-MTase und DNA. Die Absorption bei 260 nm ist in blau und die Absorption bei 280 nm ist in rot dargestellt. Das Peptid-DNA-Fragment eluiert bei dem selben Salzgehalt (17,4 min) wie freie DNA.

Deutlich erkennt man, dass das Peptid-DNA-Fragment bei dem selben Salzgehalt eluiert wie die freie DNA. Die negative Ladung der DNA wird durch das kovalent gebundene Peptidfragment nicht signifikant abgeschirmt, so dass bei dem Peptid-DNA-Fragment im Gegensatz zum Protein-DNA-Komplex die Eigenschaften der DNA bei der Anionenaustauscher-Chromatographie überwiegen. Damit sichergestellt werden konnte, dass es sich bei dem mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigten Produkt tatsächlich um ein kovalentes Peptid-DNA-Fragment handelt, wurde das Produkt mit Hilfe der PNK radioaktiv markiert und mittels Schagger-Jagow Gelelektrophorese analysiert. In Abb. 40 ist das erhaltene Autoradiogramm abgebildet.



**Abb. 40:** Autoradiogramm des fragmentierten, kovalenten Komplexes aus Dam DNA-MTase und DNA. Neben einzelsträngiger DNA (ss DNA), doppelsträngiger DNA (ds DNA) und dem Komplex (XL) ist der fragmentierte Komplex (Fragmentierung) aufgetragen. Deutlich erkennt man, dass es sich um ein Peptid-DNA-Fragment handelt, da dieses eine geringere Mobilität als ds DNA im Schagger-Jagow-Gel besitzt.

Nach der anionenaustauscher-chromatographischen Aufreinigung wurde das DNA-haltige Peptidfragment in Wasser überführt und eine N-terminale Peptidsequenzierung durchgeführt. Die Ansequenzierung dieses Fragments durch Edman-Abbau zeigte folgende Aminosäuresequenz:

1	2	3	4	5	6	
[R]	D	P	P	X	A	...

Da die Probe nicht ganz homogen war, waren mehrere parallele Sequenzen vorhanden. Doch konnte eine Hauptsequenz über die Zyklen 2-6 gut gelesen werden. Die Zyklen 2-4 sind trotz

---

Hintergrund aussagekräftig und zeigen als Hauptsignale die Aminosäuren D, P, P des erwarteten proteolytischen Fragments der Dam DNA-MTase. Somit leitet sich das modifizierte Peptid von den Aminosäuren 180 – 185 (CDPPYA) der Dam DNA-MTase ab. Die Abwesenheit des erwarteten Cysteins im ersten Zyklus ist kein Widerspruch, da sich diese Aminosäure im Edman-Abbau nur schwer detektieren läßt. Das fehlende Tyrosinsignal im fünften Zyklus bestätigt die Vermutung, dass dieser Aminosäurerest bei der lichtinduzierten *Crosslinking*-Reaktion eine kovalente Bindung mit der DNA ausbildet. Der daran anschließende Zyklus zeigt ein Signal für A bevor die Sequenz abbricht und die Signale vor dem heterogenen Hintergrund nicht mehr lesbar sind.

## 4 DISKUSSION

Die DNA ist der Träger der Erbinformation in allen zellulären Lebensformen sowie in vielen Viren. Zum Ablesen dieser Information bedarf es einer Vielzahl von Proteinen. Proteine, die an die DNA binden, können diese biegen, knicken oder sogar eine ganze Base aus der doppelsträngigen  $\alpha$ -Helix herausklappen. Neben diesen Deformationen in den Protein-DNA-Komplexen kann die DNA als solche auch kovalent verändert werden, indem bestimmte Basen modifiziert werden. Eine solche Modifikation wird beispielsweise durch DNA-MTasen verursacht. Diese Enzyme erkennen bestimmte Sequenzen innerhalb der doppelsträngigen DNA und katalysieren die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors AdoMet auf ihre Zielbase innerhalb der Erkennungssequenz. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Funktionsweise der N6-Adenin Dam DNA-MTase aus *E. coli* untersucht werden. Der Mechanismus der Enzymkatalyse sollte biophysikalisch näher charakterisiert werden. Aus diesen dynamischen Prozessen kann man die Bindungsreaktion und Methylgruppenübertragung beschreiben. Zusätzlich zu diesen funktionellen Untersuchungen sind strukturelle Untersuchungen von großem Interesse. Mit ihnen erhält man direkte Informationen über Wechselwirkungen zwischen dem Protein, DNA und dem Cofaktor. Beide Aspekte sollten in dieser Arbeit berücksichtigt werden.

### 4.1 Basenausklapp-Mechanismus der Dam DNA-MTase

Betrachtet man die DNA mit ihrer doppelt-helikalen Struktur, so erscheint es schwierig sich eine enzymkatalysierte Methylgruppenübertragung von AdoMet auf die DNA ohne Deformation der DNA Struktur vorzustellen. Dieses Problem wird besonders deutlich bei den C5-Cytosin-DNA-MTasen, die zur Methylierung eine kovalente Enzym-Substrat Zwischenstufe ausbilden (Wu *et al.*, 1987). Die Arbeiten von Smith (Baker *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1987) an menschlicher DNA-MTase, die eine große Ähnlichkeit zu den bakteriellen C5-Cytosin DNA MTasen besitzt, zeigen, dass die Identität der Zielbase nicht entscheidend für die Erkennung durch das Substrat ist. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass die Methylierungsreaktion der Base einen nicht-planaren Übergangszustand passiert, der die natürliche Basenstapelung der DNA stören sollte. In dem Reaktionsmechanismus sollten sich folglich die Thiolgruppe des konservierten Cysteinrestes und die Methylgruppe des Cofaktors

AdoMet von entgegengesetzten Seiten der Ebene des Cytosinringes nähern. Doch wird dieser Platz ober- und unterhalb der Nukleobase gewöhnlich von den Nachbarbasen eingenommen, so dass für das Cytosin eine extrahelikale Position vorgeschlagen wurde. Die Existenz von extrahelikalen Basen in der DNA-Struktur in Abwesenheit von DNA-bindenden Proteinen wurde bereits bei Untersuchungen der Lebensdauer von Basenpaaren vorgeschlagen und bei NMR-Untersuchungen an DNA mit Basenfehlpaarungen oder abasischen Stellen bestätigt (Guest *et al.*, 1991; Kao *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1998). Die ganze Reichweite dieser Überlegungen wurde jedoch erst mit der Aufklärung der ersten Kristallstruktur einer C5-Cytosin-DNA-MTase im Komplex mit DNA und dem Cofaktor deutlich (Klimasauskas *et al.*, 1994). Die Kristallstruktur des ternären Komplexes von M·*HhaI* zeigt deutlich ein extrahelikales Zielcytosin. Dabei wird die Zielbase um ca. 180° aus der DNA-Helix herausgedreht und in dem katalytischen Zentrum positioniert. Ein solcher Basenausklapp-Mechanismus konnte auch für eine weitere C5-Cytosin-DNA-MTase (M·*HaeIII*) durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (Reinisch *et al.*, 1995). Neben diesen beiden C5-Cytosin-DNA-MTasen ist auch für die N6-Adenin-DNA-MTase M·*TaqI* ein solcher Basenausklapp-Mechanismus beobachtet worden (Goeddecke *et al.*, 2001). Folglich liegt es nahe, den Basenausklapp-Mechanismus als allgemeingültigen Mechanismus für DNA-MTasen anzunehmen. Um diese Allgemeingültigkeit zu verifizieren, wurden Untersuchungen an der Dam DNA-MTase diesbezüglich durchgeführt. Für diese Untersuchung wurde das 2-Ap als Fluoreszenzsonde in die DNA eingebaut. Innerhalb der helikalen Struktur der DNA ist die 2-Ap-Fluoreszenz aufgrund von Basenstapelungswechselwirkungen stark herabgesetzt. Fluoreszenztitrationen eines Duplex-ODNs, in dem das Zieladenin durch 2-Ap ersetzt ist, mit der Dam DNA-MTase zeigten einen sechzehnfachen Anstieg der 2-Ap Fluoreszenz. Dieser sehr starke Fluoreszenzanstieg ist im Einklang mit einem Herausklappen des 2-Ap-Restes aus der DNA durch das Enzym. Somit kann auch für die Dam DNA-MTase ein Basenausklapp-Mechanismus angenommen werden, der die Allgemeingültigkeit für DNA-Mtasen unterstützt.

Verbunden mit dieser Fluoreszenztitration konnte eine weitere sehr interessante Beobachtung gemacht werden. Bei dieser Titration handelte es sich um eine sogenannte *active-site*-Titration, mit der die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes bestimmt werden kann. Es war deutlich eine 2:1-Stöchiometrie erkennbar. Demnach sollten zwei Dam DNA-MTase Moleküle an ein Molekül DNA binden. Diese Beobachtung ist neu und es wird allgemein davon ausgegangen, dass DNA-Mtasen als Monomer an ihre Erkennungssequenz binden.



## 4.2 Stöchiometrie des Dam-DNA-Komplexes

Die Dam DNA-MTase liegt in Lösung als Monomer vor. In den Fluoreszenztitrationen von 2-Ap-haltigem Duplex-ODN mit der Dam DNA-MTase zeigte sich aber, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Bislang wurde bei keiner anderen DNA-MTase ein vergleichbares Verhalten mittels Fluoreszenztitrationen beschrieben, so dass weitere Untersuchungsmethoden gefunden werden sollten, die diese Dimerisierung bei der DNA-Bindung bestätigen. Für diese Untersuchungen wurde die *Photocrosslinking*-Reaktion mit 5-Ioduracil als Chromophor in der DNA verwendet. Die Bestrahlung von 5-Ioduracil-haltiger DNA in Gegenwart DNA-bindender Proteine ist eine bekannte Methode, um kovalente Komplexe zwischen beiden Bindungspartnern darzustellen. In dieser Arbeit ist es gelungen einen Komplex aus Hairpin-DNA und zwei daran kovalent gebundenen Dam DNA-MTasen zu isolieren und massenspektroskopisch nachzuweisen. Die beobachtete Masse von 75868 g/mol steht im Einklang mit einer berechneten Masse von 76311 g/mol und weicht lediglich um 0,6 % von der berechneten Masse ab. Da eine solche kovalente Bindung nicht zwangsläufig etwas über das Verhalten der Dam DNA-MTase in Lösung aussagt, wurden weitere Experimente bezüglich der Dimerisierung unter nativen Bedingungen durchgeführt. Zur Bestimmung von Bindungsstöchiometrien unter nativen Bedingungen eignet sich die analytische Ultrazentrifugation. In Gleichgewichtsexperimenten mit verschiedenen Verhältnissen von Dam DNA-MTase und DNA konnten die experimentellen Daten am besten mit einem Modell erklärt werden, bei dem zwei Dam DNA-MTase-Moleküle an die DNA binden. Damit ist es erstmalig bei der Dam DNA-MTase gelungen eine 2:1-Stöchiometrie direkt nachzuweisen. Dieses ist zwar ungewöhnlich, doch gibt es schon seit längerem Anhaltspunkte für eine Funktion der Dam DNA-MTase als Dimer. So wurde bereits die Dam DNA-MTase aus dem T4-Phagen bezüglich ihrer Stöchiometrie untersucht (Zinovev *et al.*, 1996). Die T4-Phagen Dam DNA-MTase besitzt die gleiche Erkennungssequenz wie das Enzym aus *E. coli* und methyliert ebenfalls die N6-Position des Adenins. Die Stöchiometrie der Bindung der T4-Dam DNA-MTase an spezifische DNA wurde mittels Gelfiltration und Succrose-Gradienten-Ultrazentrifugation untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Methoden, dass jeweils zwei DNA-MTase-Moleküle sowohl an 32 Basenpaare lange Duplex-ODN wie auch an 20 Basenpaare lange DNA binden. Lediglich an der 12 Basenpaare langen DNA konnte nur eine 1:1-Bindungsstöchiometrie nachgewiesen werden. Das Nicht-Vorhandensein des Dimers bei der kurzen DNA kann an einer ungenügenden Affinität bzw. Stabilität des

Komplexes liegen. Es ist natürlich auch denkbar, dass die zweite T4-DNA-MTase nicht spezifisch an die längeren Duplexe bindet.

In weiteren Untersuchungen bezüglich der AdoMet-Bindung der Dam DNA-MTase aus *E. coli* wurde gezeigt, dass der Cofaktor zwei Funktionen ausübt. Zum einen wirkt er als allosterischer Effektor und zum anderen als Methylgruppendonor (Bergerat *et al.*, 1990). Zur Erklärung dieser Beobachtung können mehrere Modelle aufgestellt werden. Ein Modell beinhaltet eine Bindungsstelle für AdoMet pro Dam DNA-MTase Molekül. Die Bindung von AdoMet an das Enzym initiiert den allosterischen Effekt. Das zweite Modell impliziert die Existenz von zwei unterschiedlichen Bindungsstellen für AdoMet. Bei einem 32 kDa großen Protein wäre es jedoch unwahrscheinlich zwei Bindungstaschen für den Cofaktor zu finden. Deshalb erscheint ein drittes Modell, in dem jedem Enzym eine AdoMet Bindungsstelle zugesprochen wird und dafür zwei DNA-MTase-Moleküle nicht symmetrisch an die DNA binden, wahrscheinlicher.

Wie bereits beschrieben gehört die Dam DNA-MTase nicht zu einem Restriktions-Modifikations-System und genau darin könnte auch ein möglicher Grund für das überraschende DNA-Bindungsverhalten der Dam DNA-MTase liegen.

Ein Restriktions-Modifikations-System setzt sich aus einer Restriktions-Endonuklease und einer DNA-MTase zusammen. Das Substrat für das Restriktionsenzym ist Fremd-DNA, die an definierten Erkennungsstellen geschnitten wird. Das Substrat für das Modifikationsenzym ist die zelleigene DNA, die innerhalb der Erkennungssequenzen der Endonuklease methyliert wird und dadurch vor dem Verdau durch das Restriktionsenzym geschützt wird. Die Restriktions-Modifikations-Systeme werden in drei große Gruppen unterteilt (Bickle, 1987). Es sind mittlerweile über 3000 Typ II Restriktionsendonukleasen bekannt. Diese erkennen kurze für gewöhnlich palindromische Sequenzen von 4-8 Basenpaaren und spalten die DNA in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  innerhalb dieser Sequenzen oder in nächster Nähe (Pingoud *et al.*, 2001). Für gewöhnlich wird diese Funktion durch ein Homodimer aus zwei Restriktionsenzymen durchgeführt. Da die Dam DNA-MTase aber kein entsprechendes Restriktionsenzym besitzt, ist es durchaus möglich, dass gerade aufgrund ihrer Alleinständigkeit die Dam DNA-MTase ihre Methylierungsfunktion als Dimer erfüllt.

Kürzlich ist eine weitere DNA-MTase entdeckt worden, die eine ungewöhnliche Funktionsweise besitzt. Es handelt sich um die Typ IC DNA-MTase M·*EcoR124I*. Diese DNA-MTase ist ein trimeres Enzym mit einer molekularen Masse von 162 Da (Smith *et al.*, 2001). Dieses Enzym setzt sich aus zwei Molekülen der Untereinheit HsdM und einem Molekül der Untereinheit HsdS zusammen und folgt der Stöchiometrie  $M_2S_1$  (Taylor *et al.*,

1992). Somit binden zwei katalytische Untereinheiten an die DNA. Dieses ähnelt dem beschriebenen Verhalten der Dam DNA-MTase. Es wird damit deutlich, dass DNA-MTasen durchaus auch eine andere Bindungsstöchiometrie zur DNA haben können und im Laufe der Evolution auf ihre jeweilige Funktion optimiert wurden.

### 4.3 Bindung der Dam DNA-MTase an DNA

Die Wechselwirkung von der Dam DNA-MTase mit spezifischer 2-Ap haltiger DNA führte zu einer Erhöhung der 2-Ap-Fluoreszenz. Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an diese DNA bindet, wurden Titrations mit verschiedenen DNA Konzentrationen durchgeführt. Diese Daten konnten anschließend mittels zweier denkbarer Modelle ausgewertet werden. Das erste Modell geht davon aus, dass die Dam DNA-MTase Moleküle nacheinander an die DNA binden. Die gemessene Signalzunahme wurde dabei am besten durch die Annahme beschrieben, dass beide Bindungsereignisse jeweils einen Teil zur Fluoreszenzzunahme beitragen. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte liegen bei 112 nM für die Bindung der ersten Dam DNA-MTase und 224 nM für die zweite Bindung. Es konnte in allen durchgeführten Titrations kein kooperatives Verhalten festgestellt werden. Das zweite Modell geht davon aus, dass sich in der Lösung zunächst das Dimer ausbildet und dieses schließlich an die DNA bindet. Auch mit diesem zweiten denkbaren Modell war es möglich die erhaltenen Daten auszuwerten. Für die Dimerisierung ergab sich ein  $K_D$ -Wert von 25  $\mu$ M und für die anschließende Bindung an DNA ein Wert von 2,8 nM. Prinzipiell sind beide Modelle zur Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA möglich. Da aber ein Dimer der Dam DNA-MTase in Abwesenheit von DNA nicht nachgewiesen werden konnte, erscheint es wahrscheinlicher, dass die Dam DNA-MTase Moleküle nacheinander an die DNA binden. Interessanterweise liegen die beiden erhaltenen  $K_D$ -Werte in der selben Größenordnung wie der  $K_D$ -Wert der monomeren Bindung von M-*Taq*I an DNA (Holz *et al.*, 1998b).

Mittels Verdrängungs- und kompetitiven Titrations konnten auch die  $K_D$ -Werte für spezifische hemimethylierte DNA und für DNA mit einer abasischen Stelle an der Zielposition bestimmt werden. Die  $K_D$ -Werte wurden entweder direkt durch Verdrängung des 2-Ap-haltigen Duplex-ODNs aus dem Komplex mit der Dam DNA-MTase oder durch eine kompetitive Titration in Gegenwart des 2-Ap-haltigen Duplexes erhalten. Dabei stellte sich heraus, dass das natürliche Substrat etwa die gleiche Affinität zur Dam DNA-MTase besitzt wie die 2-Ap-haltige DNA. Bei der Auswertung dieser Daten wurde der Einfachheit halber

angenommen, dass die Dam DNA-MTase direkt als Dimer an DNA bindet. Die aus der kompetitiven Titration erhaltenen  $K_D$ -Werte liegen für das 2-Ap-haltige Duplex-ODN bei 112 nM und für die hemimethylierte DNA bei 142 nM. Aus der direkten Titration ergab sich für 2-Ap-haltige DNA 298 nM und für hemimethylierte DNA 111 nM.

Vergleichbare Titrationsen mit dem Duplex-ODN, das eine abasische Stelle enthielt, lieferten in der kompetitiven Titration eine Dissoziationskonstante von 69 nM für die 2-Ap-haltige DNA und einen  $K_D$ -Wert von 0,5 nM für die DNA mit der abasischen Stelle. Diese Werte stimmten mit denen aus der direkten Titration sehr gut überein. Diese Titrationsen zeigen, dass die Dam DNA-MTase um einen Faktor von ca. 100 besser an spezifische DNA bindet, der die Zielbase fehlt. Dieses Verhalten wurde ebenfalls durch vergleichbare Titrationsen bei den N6-Adenin-DNA-MTasen *M·TaqI* (Holz *et al.*, 1999), *M·EcoRV* (Cal *et al.*, 1997) und *M·EcoRI* (Allan *et al.*, 1998) gefunden. Mit diesen Enzymen wurde beobachtet, dass die Affinität der MTasen zu Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle um den Faktor vier bis sogar 200 höher ist als die Bindung an das natürliche Substrat. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einem Basenausklapp-Mechanismus. Betrachtet man die Energien, die überwunden werden müssen, um die Zielbase aus der DNA herauszuklappen, so stellt man fest, dass für das Herausklappen der Base zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Partnerbase Thymin aufgebrochen werden müssen. Weiterhin müssen auch die  $\pi$ -Basenstapelwechselwirkungen zu den Nachbarbasen überwunden werden. Bei beiden Vorgängen wird Energie verbraucht. Im ausgeklappten Zustand wird dagegen Energie gewonnen, da das Zieladenin  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit dem aktiven Zentrum der DNA-MTasen ausbilden kann. Im Fall der C5-Cytosin-DNA-MTasen *M·HhaI* (Klimasauskas *et al.*, 1994) und *M·HaeIII* (Reinisch *et al.*, 1995) kann zudem eine Proteinschleife in das innerhalb der DNA entstandene Loch schwenken und dort hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen mit den umgebenden DNA-Basen aufnehmen. Ist jedoch die Zielbase erst gar nicht vorhanden, so können diese Wechselwirkungen direkt ausgebildet werden, ohne dass vorher Energie für das Herausklappen der Zielbase aufgebracht werden muß. Die Folge dessen ist eine kleinere Dissoziationskonstante für die Bindung der DNA-MTase an Duplex-ODN mit einer abasischen Stelle.

Die vergleichbaren Dissoziationskonstanten von 2-Ap-haltiger DNA und hemimethylierter DNA können durch die strukturelle Verwandtschaft von 2-Ap und Adenin erklärt werden. Adenin als natürliches Substrat und 2-Ap unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Struktur und Größe voneinander. Weiterhin bildet 2-Ap Watson-Crick ähnliche

Wasserstoffbrückenbindungen zu Thymin aus und folglich ist die Struktur der DNA durch dessen Einbau nicht gestört.

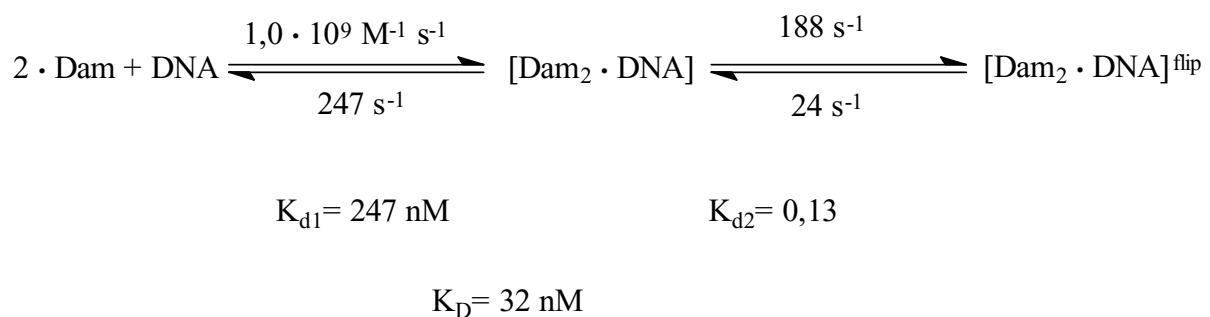
Im Zuge dieser Titrationsen mit 2-Ap-haltiger DNA zeigte sich, dass die Anwesenheit des Cofaktors einen starken Einfluß auf das Fluoreszenzverhalten des 2-Ap hat. Fügt man zu einer Lösung aus Cofaktor-freier Dam DNA-MTase und 2-Ap-haltiger DNA AdoMet hinzu, so nimmt die Fluoreszenz um 83 % ab. Die Auswertung dieser Fluoreszenzabnahme ergab einen  $K_D$ -Wert für die Bindung des Cofaktors AdoMet an den Dam-DNA-Komplex von 3,6 nM. Vergleichbare Titrationsen mit AdoHcy lieferten einen  $K_D$ -Wert von 753 nM. AdoHcy bindet um einen Faktor von rund 200 schlechter an den Dam-DNA-Komplex als AdoMet. Dieses ist aufgrund der Enzymkatalyse verständlich, da die Methylgruppe von AdoMet auf die Zielbase übertragen wird und deshalb die Bindung von AdoMet besser sein sollte als die Bindung des Produkts der Methylgruppenübertragung. Es stellt sich natürlich in diesem Zusammenhang die Frage, wodurch die Fluoreszenz derart stark herabgesetzt wird. Möglicherweise wird das 2-Ap durch die Bindung von AdoMet teilweise wieder in die DNA-Helix zurückgeklappt. Doch erscheint diese Möglichkeit als unwahrscheinlich, denn durch das Herausklappen wird bei den DNA-MTasen die Übertragung der Methylgruppe erst ermöglicht. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Fluoreszenzabnahme ist, dass der Komplex aus Dam DNA-MTase und DNA durch das Binden des Cofaktors eine Konformationsänderung erfährt. Durch diese Konformationsänderung könnte sich die direkte Umgebung des ausgeklappten 2-Aps im aktiven Zentrum ändern. Sie könnte hydrophober werden und somit eine Abnahme der Fluoreszenz zur Folge haben (Ward *et al.*, 1969). Diese Fluoreszenzabnahme durch Zugabe von AdoMet wurde auch bei vergleichbaren Titrationsen mit der Dam DNA-MTase aus dem Bakteriophagen T4 beobachtet (Malygin *et al.*, 2001). In Titrationsen von 2-Ap-haltigem Duplex-ODN mit der Dam DNA-MTase aus dem T4 Bakteriophagen nimmt die Fluoreszenz um den Faktor 50 zu. Gibt man am Ende der Titration den Cofaktor AdoMet hinzu, so nimmt die Fluoreszenz um ca. 60 % ab. Beide Dam DNA-MTasen zeigen ein vergleichbares Verhalten. Dieses Verhalten wurde für die T4 Dam DNA-MTase folgendermaßen interpretiert (Malygin *et al.*, 2001): in Abwesenheit von AdoMet bindet die T4 Dam DNA-MTase an die Erkennungssequenz und klappt die Zielbase aus der DNA heraus. Es wird zur Hälfte das 2-Ap und zur anderen Hälfte die Zielbase am Gegenstrang herausgeklappt. Die Zugabe von AdoMet bewirkt eine allosterische Konformationsänderung in der T4 Dam DNA-MTase, die eine Reorientierung des Enzyms zu dem nicht markierten Strang bewirkt. Dieses führt zum bevorzugten Herausklappen der nicht markierten Zielbase im Gegenstrang und das zuvor herausgeklappte 2-Ap wird wieder zurückgeklappt, wodurch

die Fluoreszenz abnimmt. Diese Umorientierung der DNA-MTase geschieht durch ein Dissoziations-Reassoziations-Gleichgewicht oder durch eine Reorientierung ohne Dissoziation von der DNA. Dieses wäre ein denkbarer Mechanismus auch für die Dam DNA-MTase aus *E. coli*. Im Falle der Dam DNA-MTase aus *E. coli* erscheint eine derartige Umorientierung aber eher unwahrscheinlich, da das Enzym bereits als Dimer an die palindromische Erkennungssequenz bindet.

#### 4.4 Kinetik der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase

Zunächst wurde die Assoziation der Dam DNA-MTase an die DNA untersucht. Erneut wurde ein Duplex-ODN mit 2-Ap an der Zielposition als Fluoreszenz-Sonde verwendet. Die einzelnen Bindungskinetiken bei unterschiedlichen Dam DNA-MTase-Konzentrationen konnten einfach-exponentiell ausgewertet werden. Die erhaltenen beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  zeigten eine hyperbolische Abhängigkeit von der Dam DNA-MTase Konzentration. Dies zeigt, dass es sich bei der Assoziation der Dam DNA-MTase an die DNA um mindestens einen Zwei-Schritt-Mechanismus handelt. Der erste Schritt wird der initialen Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA zugeordnet und der zweite Schritt dem Herausklappen des 2-Ap-Rests aus der DNA. Bei geringem Überschuß der Dam DNA-MTase gegenüber der DNA ist die Bindung diffusionskontrolliert und die Assoziation bestimmt die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$ . Mit zunehmendem Überschuß an Dam DNA-MTase wird die bimolekulare Assoziation immer schneller und das Herausklappen des 2-Ap-Rests wird geschwindigkeitsbestimmend. Die Dissoziation der Dam DNA-MTase von der DNA ist durch Verdrängungsexperimente bestimmt worden. Die Dissoziationskinetiken waren einphasig und konnten mit einer einfach-exponentiellen Gleichung ausgewertet werden. Da die Dam DNA-MTase zu DNA mit einer abasischen Stelle eine sehr viel höhere Affinität besitzt als zu mit 2-Ap-markierter DNA, wurde bei allen verwendeten Konzentrationen eine vollständige Verdrängung mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{off}}$  von ca.  $30 \text{ s}^{-1}$  beobachtet. Die Experimente mit unmodifizierter hemimethylierter DNA zeigten dagegen bei den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten eine exponentielle Konzentrationsabhängigkeit. Dieses liegt daran, dass aufgrund der nahezu identischen  $k_{\text{d}}$ -Werte für die beiden Duplex-ODNs dieser Prozess reversibel ist. Der beobachtete  $k_{\text{off}}$ -Wert setzt sich in diesem Fall aus mehreren Geschwindigkeitskonstanten zusammen und zeigt bei geringen Dam DNA-MTase-

Konzentrationen eine exponentielle Abnahme. Mit zunehmender Menge an nicht markiertem Duplex-ODN nimmt die Amplitude zu und nähert sich bei großen Konzentrationen einem Grenzwert. Dieses Verhalten zeigt, dass aufgrund der ähnlichen Bindung der Dam DNA-MTase sowohl zu unmarkierter DNA als auch zum Kompetitor, das Substrat durch den Kompetitor nicht vollständig aus dem Komplex verdrängt werden kann. Erst bei großem Überschuss an Kompetitor wird dieser Prozess irreversibel und der beobachtete  $k_{\text{off}}$ -Wert wird konzentrationsunabhängig. Aus diesem Verdrängungsexperiment erhält man für  $k_{\text{off}}$  einen Wert von  $32 \text{ s}^{-1}$ , der sehr gut mit dem aus den Verdrängungsexperimenten mit 2-Ap-markierter DNA übereinstimmt. Ausgehend von diesen Experimenten kann folgendes Schema aufgestellt werden:



Es kann für die Dam DNA-MTase mittels Stopped-Flow Experimenten sowohl die Bindung an die DNA als auch das Herausklappen der Zielbase aus der DNA beobachtet werden. Bei der N6-Adenin DNA-MTase *M·TaqI* konnte in vergleichbaren Experimenten nur das Herausklappen der Zielbase mit einer beobachteten Geschwindigkeitskonstante von  $20 \text{ s}^{-1}$  gemessen werden (Holz, 1998). Das erste Gleichgewicht, die Bindung von *M·TaqI* an die DNA konnte nicht beobachtet werden, da sich dieses initiale in diesem Fall zu schnell einstellt. Doch neben diesen beiden Gleichgewichten konnte ein zusätzliches drittes Gleichgewicht mittels Tryptophan-Fluoreszenz-Messungen beobachtet werden. Es schließt sich mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von  $2 \text{ s}^{-1}$  dem Herausklappen der Zielbase an und wird einer Konformationsänderung des Komplexes zugeordnet. Für die DNA-MTase *M·TaqI* wurde vermutet, dass diese dritte Phase mit einer Schleifenbewegung der sehr flexiblen Aminosäurereste 110-120 einhergeht (Friederich, 2001). Die Schleifenbewegung, die nach Fluoreszenzmarkierung durch Beobachtung der Dansylfluoreszenzänderung untersucht wurde, lieferte jedoch zwei Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$ . Wahrscheinlich führt der erste Schritt der Schleifenbewegung, der mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $86 \text{ s}^{-1}$

abläuft, nicht zu der in der Struktur des ternären Komplexes beobachteten Konformation (Goedecke *et al.*, 2001). Erst nach dem Herausklappen der Zielbase nimmt die Schleife mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von  $2 \text{ s}^{-1}$  die endgültige Konformation ein. Somit muß für *M·TaqI* ein vierstufiger Bindungsmechanismus angenommen werden. Zunächst kommt es zu einer schnellen Assoziation des Proteins mit der DNA, welche die nachfolgenden Gleichgewichte nicht beeinflußt und die mittels Stopped-Flow-Technik nicht messbar ist. Danach bildet die Schleife mit den Aminosäuren 110-120 und einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von  $86 \text{ s}^{-1}$  erste Kontakte zur Erkennungssequenz aus. Anschließend wird die Zielbase mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von  $20 \text{ s}^{-1}$  aus der DNA herausgeklappt. Der letzte Schritt in diesem Mechanismus ist eine weitere Konformationsänderung des Proteins mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von  $2 \text{ s}^{-1}$ . Diese Konformationsänderung geht mit der endgültigen Fixierung der Schleife einher.

Für die C5-Cytosin DNA-MTase *M·HhaI* ist ebenfalls ein Mehrstufen-Bindungsmechanismus beobachtet worden (Vilkaitis *et al.*, 2000). Der erste Schritt ist eine Kombination aus diffusionskontrollierter Bindung der DNA-MTase an die Erkennungssequenz mit einer bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten von ca.  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gefolgt von nahezu gleichzeitigem Herausklappen der Zielbase mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  größer als  $2000 \text{ s}^{-1}$ . Doch anders als bei der Dam DNA-MTase können diese beiden Schritte durch Stopped-Flow-Experimente nicht getrennt voneinander beobachtet und deshalb auch nicht explizit bestimmt werden. Der nachfolgende Schritt in diesem Mechanismus wird vergleichbar zu *M·TaqI* einer Konformationsänderung des Komplexes aus *M·HhaI* und DNA mit herausgeklappter Zielbase zugeordnet. Ein solcher Mechanismus ist auch bei vergleichbaren Messungen für die DNA-MTase *EcoRI* bestätigt worden (Allan *et al.*, 1998).

Da bei der Dam DNA-MTase nur ein Fluorophor als Sonde, nämlich das 2-Ap, zur Verfügung stand, kann nicht ausgeschlossen werden, ob sich der Assoziation an die DNA und dem Herausklappen der Zielbase nicht noch weitere Gleichgewichte anschließen. Die Konformationsänderungen in dem Protein müssen nicht zwangsläufig die 2-Ap-Fluoreszenz beeinflussen, so dass darüber keine Aussage gemacht werden kann.

Bei weiteren Untersuchungen zum Bindungsmechanismus der Dam DNA-MTase an die DNA wurde der Einfluß des Cofaktors auf diese Gleichgewichte untersucht. Wird die Dam DNA-MTase mit AdoMet vorinkubiert, so hat dieses keinen deutlichen Einfluß auf die Assoziation der Dam DNA-MTase an die DNA und auf das Herausklappen der Zielbase. Es schließt sich allerdings ein weiteres Gleichgewicht an diese beiden Schritte an. Dieser dritte Schritt ist nahezu unabhängig von der Dam-DNA-MTase-Konzentration und hat eine beobachtete



Geschwindigkeitskonstante von  $4 \text{ s}^{-1}$ . Da dieser dritte Schritt abhängig ist von der Anwesenheit des Cofaktors AdoMet, handelt es sich um eine Konformationsänderung des ternären Komplexes aus Dam DNA-MTase, AdoMet und DNA mit herausgeklappter Zielbase. Auffällig ist, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  von  $4 \text{ s}^{-1}$  gut mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  von  $2 \text{ s}^{-1}$  übereinstimmt, die bei der DNA-MTase *M·TaqI* für den letzten Schritt beobachtet wurde. Dieser geht mit einer Konformationsänderung, die zur endgültigen Fixierung der DNA-bindenden Schleife führt, einher. Möglicherweise liegt auch bei der Dam DNA-MTase eine vergleichbare Schleifenbewegung vor, die aber im Gegensatz zu *M·TaqI* AdoMet-abhängig ist und die Fluoreszenz des extrahelikalen 2-Ap-Restes herabsetzt.

## 4.5 Kristallisation der Dam DNA-MTase

Die Voraussetzung zur Lösung der Kristallstruktur eines Proteins ist es, Kristalle zu züchten. Dieses wurde in dieser Arbeit erfolgreich mit der Dam DNA-MTase in Gegenwart von 12-Basenpaare-langer DNA durchgeführt. Für die Kristallisation ist die Methode des hängenden Tropfens verwendet worden. Nachdem erste kleine Kristallbüschel gewachsen sind, wurden die Bedingungen durch Variation der Zusammensetzung der Protein- und Reservoirlösung optimiert. Animpfen der Proteinlösung mit Seedlösungen führte zu deutlich größeren und teilweise auch einzelnen Kristallen, die anschließend zur Datensammlung verwendet wurden. Die Daten konnten bis zu einer Auflösungsgrenze von  $2,1 \text{ \AA}$  gesammelt werden.

Allerdings ist es bislang noch nicht gelungen aus diesen Daten die Kristallstruktur der Dam DNA-MTase im Komplex mit DNA zu lösen. Eine große Herausforderung bei der Kristallstrukturanalyse stellt das Lösen des Phasenproblems dar. Eine häufig verwendete Methode zur Lösung dieses Problems ist die Methode des *molekularen Ersatzes*. Diese Methode wurde auch für die Phasierung der Daten der Dam DNA-MTase eingesetzt. Als Modellstruktur wurde die Kristallstruktur der DpnM DNA-Adenin-Methyltransferase aus dem *DpnII* Restriktions-Modifikations-System verwendet (Tran *et al.*, 1998), da dieses Enzym wie die Dam DNA-MTase die gleiche Erkennungssequenz besitzt und auch die exocyclische Aminogruppe des Adenis methyliert. In Abb. 41 ist eine vergleichende Gegenüberstellung der Dam DNA-MTase Sequenz mit der DpnM DNA-MTase-Sequenz gezeigt. Dabei sind neben den beiden Aminosäuresequenzen die Sekundärstrukturelemente der DpnM DNA-MTase mit eingezeichnet.

Deutlich erkennt man, dass beide DNA-MTasen nur eine geringe Sequenzidentität von 27 % besitzen. Es fällt jedoch stark auf, dass beide DNA-MTasen hoch konservierte Bereiche besitzen. Diese hoch konservierten Bereiche finden sich in bestimmten Motiven wieder. Dazu gehören die Motive X, I und IV. Neben diesen konservierten Motiven findet man eine homologe Region, die zwischen den Aminosäureresten 128-155 liegt. Die Motive X und I werden der AdoMet-Bindungsstelle zugeordnet und das Motiv IV ist Teil der katalytischen Region.

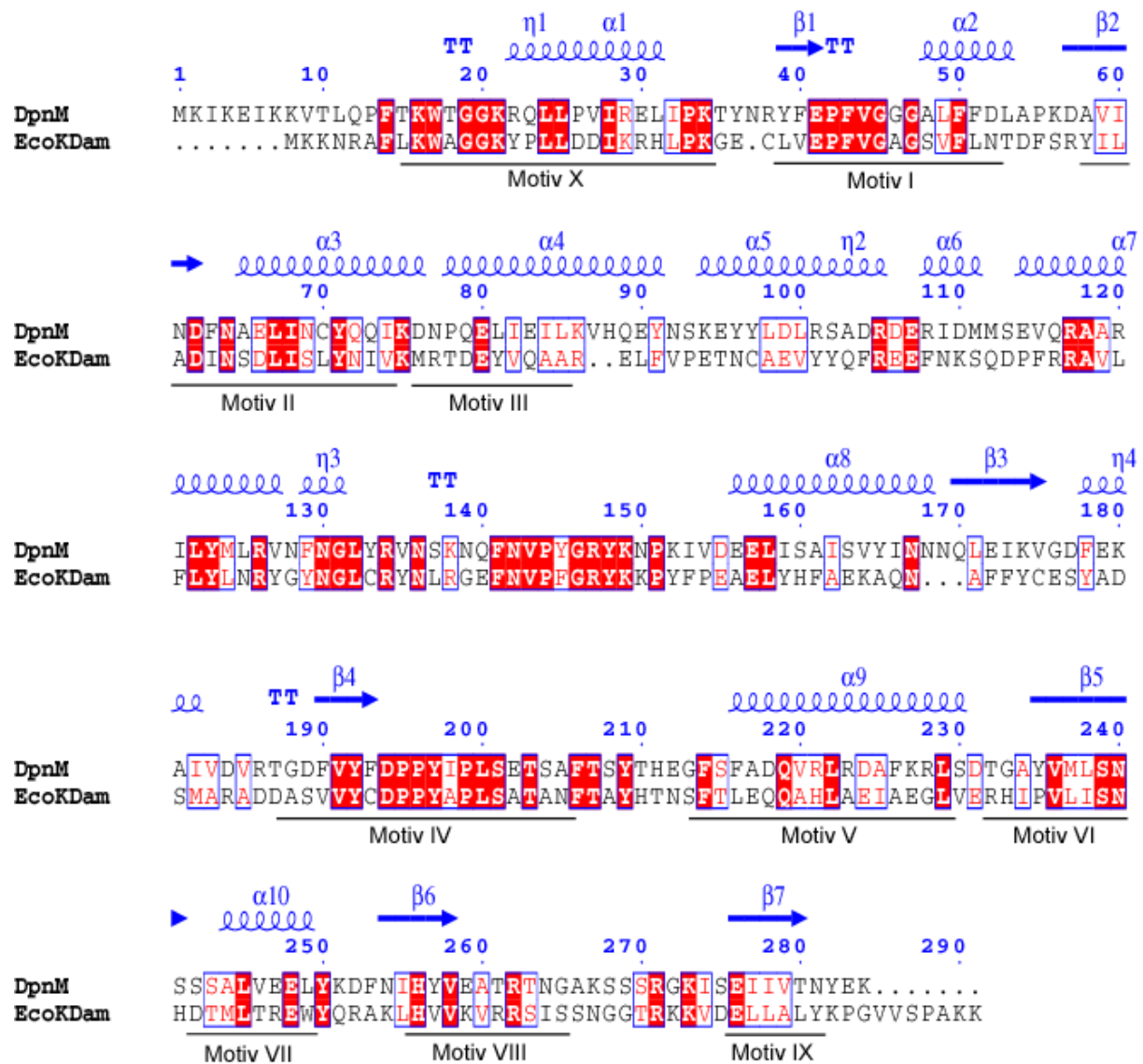
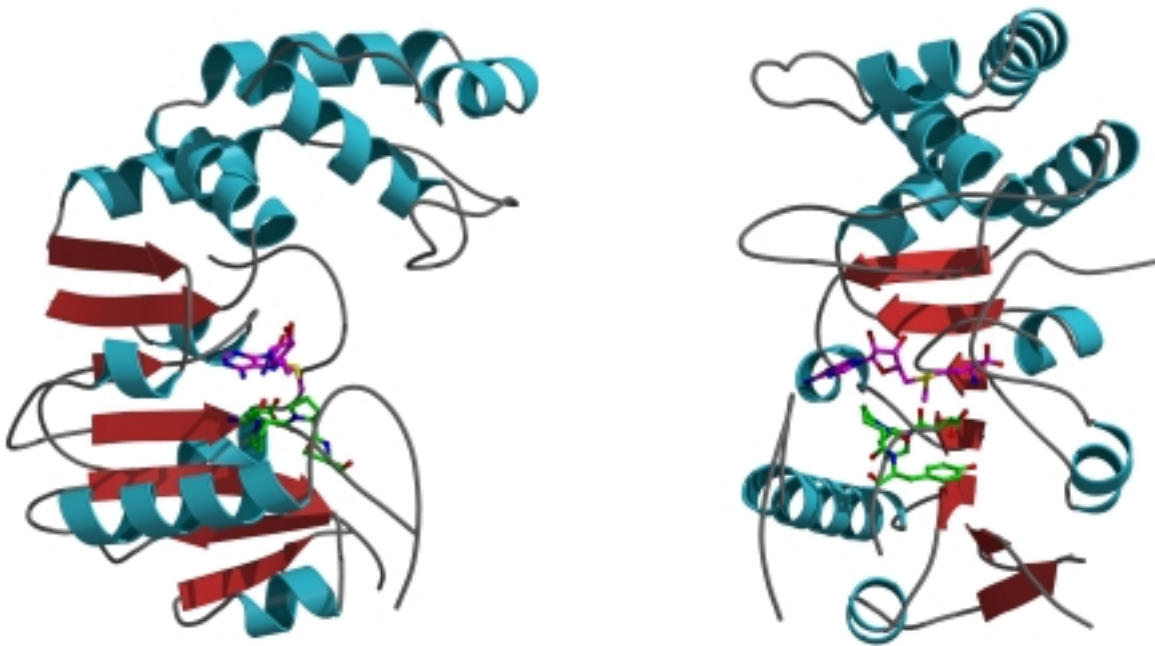


Abb. 41: Sequenzvergleich der DpnM DNA-MTase und der Dam DNA-MTase. Neben der Aminosäuresequenz sind die Sekundärstrukturelemente der DpnM DNA-MTase mit eingezeichnet. Rot hinterlegt sind die identischen Aminosäurereste und in roten Buchstaben sind homologe Aminosäurereste dargestellt.

Der Cofaktor AdoMet wird in einer Tasche an der Oberfläche der DpnM DNA-MTase gebunden und wird durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Enzym fixiert. Die Aminosäurereste Phe43, Phe63, Phe178 und Phe214 bilden eine hydrophobe Umgebung aus, die den Adeninring umgibt. Die konservierten Reste Gly45 und Gly47 ermöglichen eine Annäherung der Methionin Seitenkette an das Enzym. Die häufigsten Wechselwirkungen zwischen der DpnM DNA-MTase und ihrem Cofaktor finden in den konservierten Motiven I, II und III statt. Einige wenige Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen den Motiven X und IV und dem Cofaktor ausgebildet. In Abb. 42 ist die Kristallstruktur der DpnM DNA-MTase in Gegenwart des Cofaktors AdoMet dargestellt.



**Abb. 42:** Kristallstruktur der DpnM DNA-MTase in Gegenwart von AdoMet (Magenta). In grün ist das konservierte DPPY-Motiv dargestellt. Die linke Abbildung zeigt deutlich die C-förmige Struktur der DpnM DNA-MTase in deren Furche DNA binden könnte (vgl. Abb. 38). Die rechte Abbildung ist gedreht und man richtet seinen Blick in die AdoMet-Bindungstasche.

Die Struktur ist in Abwesenheit von DNA bestimmt worden, doch kann man in die C-förmige Struktur des Enzyms DNA gut hineinmodellieren. Der Abstand zwischen der Zielbase in der DNA und dem Cofaktor AdoMet könnte minimiert werden, wenn die DNA mit ihrer helikalen Form durch die Furche, die das C-förmige Protein ausbildet, ragen würde. In dieser Position würden die Basenpaare der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' in unmittelbarer Nähe zu einer Schleife liegen, die sich aus den Aminosäuren 130-150 zusammensetzt. Aus Abb. 42 geht deutlich hervor, dass dieser Bereich zwischen der Dam DNA-MTase und der DpnM DNA-MTase sehr konserviert ist, so dass die Bindungstasche für die DNA wahrscheinlich ähnlich aufgebaut ist. Doch reichte diese Ähnlichkeit der beiden Enzyme nicht aus, um den Datensatz der Dam DNA-MTase zu phasieren. Ein entscheidender Punkt, der bislang in den Vergleich der beiden DNA-MTasen noch nicht eingeflossen ist, ist die Tatsache, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Dadurch könnten Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen und der DNA aber auch zwischen den beiden Enzymmolekülen untereinander zu Konformationsänderungen führen, die derartig drastisch sind, dass die gesamte Struktur des Komplexes nicht mehr homolog zu der Struktur der ungebundenen DpnM DNA-MTase ist.

Weitere Möglichkeiten zur Lösung des Phasenproblems sind MIR- und MAD-Experimente. Für diese Methoden wurde in die DNA 5-Ioduracil bzw. 5-Bromuracil eingeführt. Grundsätzlich wurde bei der Kristallisation der Dam DNA-MTase in Gegenwart dieser modifizierten DNA festgestellt, dass die Qualität der Kristalle sehr viel schlechter ist als in Gegenwart der nativen DNA. Die Kristalle waren sehr viel kleiner und stark verwachsen. Mit der 5-Bromuracil-modifizierten, hemimethylierten DNA ist es zwar gelungen einen Datensatz aufzunehmen, doch hatte er eine sehr schlechte Daten-Statistik. In diesem Datensatz konnten die Bromatome nicht lokalisiert werden. Zum einen kann dafür die räumliche Nähe der einzelnen Atome zueinander verantwortlich gemacht werden. Diese führt dazu, dass das Signal für jedes einzelne Atom bei der erhaltenen Auflösung von 3.5 Å nicht aufgelöst dargestellt wird. Während der Bestrahlung der einzelnen Kristalle kann es durch Strahlenschäden auch zur Abspaltung der Brom- und besonders der Iodatome kommen, so dass diese bei der Datensammlung im Kristall nicht mehr gebunden und somit auch nicht lokalisiert vorliegen müssen. Interessant an den Kristallen mit 5-Bromuracil-haltiger DNA ist aber, dass Bromatome im Kristall vorhanden waren und somit die Dam DNA-MTase in der Tat im Komplex mit DNA kristallisiert wurde.

Als bisher günstigste Methode zur Einführung von Schwermetallen in den Kristall hat sich das Eindiffundieren erwiesen. Da die Kristalle sehr stabil sind, werden sie bei diesem

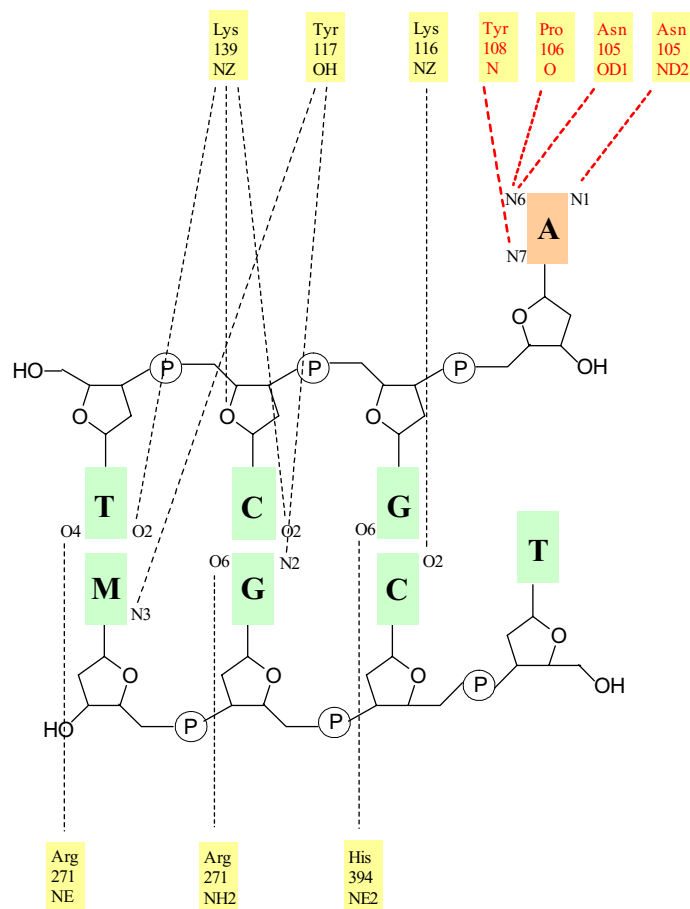
Verfahren scheinbar nicht verändert. Dadurch ist es möglich, gezielt einzelne und relative große Kristalle zu behandeln und auf diese Weise die Metalle in den Kristall einzuführen. Doch lässt sich zusammenfassend sagen, dass das größte Problem im Herstellen einzelner und ausreichend großer Kristalle liegt. Rund 95 % aller Kristalle sind verwachsen und somit für ein anschließendes Derivatisieren nicht geeignet.

## 4.6 DNA-Bingungstelle der Dam DNA-MTase

Durch Verwendung der lichtinduzierten Vernetzungsreaktion zwischen der Dam DNA-MTase und DNA mit 5-Ioduracil in der Zielposition, ist es gelungen, einen kovalenten Komplex aus DNA und Protein darzustellen. Dieser wurde anschließend proteolytisch fragmentiert und das erhaltene Peptid-DNA-Fragment mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Durch Edman-Abbau konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin 184, welches Bestandteil des konservierten DPPY-Motivs ist, die kovalente Bindung zur DNA ausbildet. Da sich diese konservierten Aminosäuren innerhalb des Motivs IV befinden, kann die allgemeine Theorie, dass dieses Motiv an der Bindung der Zielbase beteiligt ist, für die Dam DNA-MTase bestätigt werden (Malone *et al.*, 1995).

Die Beteiligung des konservierten D/NPPY-Motivs konnte mittels vergleichbarer Experimente für die N6-Adenin DNA-MTase *CviBIII* ebenfalls bestätigt werden (Holz *et al.*, 1999a). Diese DNA-MTase gehört wie auch *M·TaqI* zu der  $\gamma$ -Gruppe der DNA-MTasen und besitzt innerhalb des Motivs IV die hoch-konservierte Sequenz NPPY. In der Arbeit von Holz konnte ein Komplex aus *M·CviBIII* und DNA dargestellt und proteolytisch fragmentiert werden. Durch einen nachfolgenden Edman-Abbau und massenspektrometrischer Analyse konnte der Tyrosinrest des konservierten NPPY-Motivs als der an der kovalenten Bindung beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden.

Betrachtet man in der Kristallstruktur von *M·TaqI* im Komplex mit DNA und einem Cofaktoranalogen die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der DNA, so stellt man fest, dass dieses konservierte Motiv durch Wechselwirkungen mit dem Zieladenin dessen extrahelikale Position stabilisiert (Goedecke *et al.*, 2001). In Abb. 43 sind die Wechselwirkungen zwischen *M·TaqI* und der DNA-Erkennungssequenz schematisch dargestellt.



**Abb. 43:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen *M-TaqI* und seiner DNA-Erkennungssequenz. In rot sind die Wechselwirkungen zwischen dem konservierten Motiv NPPY und dem extrahelikalen Zieladenin dargestellt.

Insgesamt sind acht Aminosäurereste an der sequenzspezifischen Erkennung beteiligt und 13 Aminosäurereste interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken mit den Phosphat- oder Desoxyribosesauerstoffatomen. Unter den acht Aminosäuren, die sequenzspezifisch mit der DNA interagieren, sind drei, die nur mit dem extrahelikalen Adenin wechselwirken. Diese sind N105, P106 und Y108, welche alle zu dem für N-DNA-MTasen konservierten Motiv IV (N/DPPY) gehören.

Somit konnte mit dieser Struktur gezeigt werden, dass das N/DPPY-Motiv mit der Zielbase wechselwirkt und ihre extrahelikale Position stabilisiert. Die Identifizierung von Y184 in der Dam DNA-MTase deutet auf eine vergleichbare Funktion des DPPY-Motivs hin. Neben dem

Tyrosinrest, der kovalent an die DNA gebunden werden konnte und somit mit der Zielbase direkt wechselwirkt, werden wahrscheinlich auch die anderen Aminosäurereste des Motivs zur Stabilisierung der extrahelikalen Konformation des Zieladenins beitragen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Mechanismus der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase aus *E. coli* zu charakterisieren. Dabei zeigte sich in direkten Fluoreszenztitrationen von 2-Ap markierter DNA mit der DNA MTase, daß dieses Enzym einen Basenausklapp-Mechanismus verwendet und als Dimer an die DNA bindet. Dieses Dimer-Verhalten konnte mit weiteren Methoden sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen bestätigt werden.

Die Bindung der Dam DNA-MTase an DNA konnte in dieser Arbeit funktionell beschrieben werden. Ebenso wurde der Einfluß des Cofaktors auf die DNA-Bindung untersucht. Beide Charakterisierungen wurden mit nur einem Fluorophor, nämlich mit der Fluoreszenzsonde 2-Ap in DNA durchgeführt. Es stellt sich somit die Frage, ob mit dieser Sonde alle Schritte der DNA-Bindung beschrieben werden können. Damit dieses überprüft werden kann, müsste man weitere Sonden einsetzen. Doch genau darin liegt eine große Herausforderung. Denn das Einführen neuer Sonden innerhalb des Proteins setzt die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Dam DNA-MTase voraus.

Es ist gelungen, einen Datensatz für die Dam DNA-MTase aufzunehmen, doch fehlt bislang noch die Phaseninformation, um letztlich auch die Struktur bestimmen zu können. Somit müssen weitere Kristalle mit verschiedenen Derivaten gezüchtet werden.

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Dam DNA-MTase könnte nicht nur dazu beitragen, neue Sonden für funktionelle Untersuchungen in das Protein einzuführen, sondern auch Aufschluß über die Bindung des Cofaktors AdoMet geben.

Die Kristallstruktur ist somit die Voraussetzung für weitere Untersuchungen an der Dam DNA-MTase. Dadurch würde man zum einen wichtige Informationen über den katalytischen Mechanismus erhalten, der sich aufgrund der 2:1-Bindungsstöchiometrie von dem anderer DNA-MTasen unterscheiden sollte. Zum anderen könnten neue Sonden entweder in das Protein oder den Cofaktor AdoMet gezielt eingeführt werden.

Weiterhin ist es in dieser Arbeit gelungen, unter Verwendung der lichtinduzierten Vernetzungsreaktion zwischen der Dam DNA-MTase und 5-Ioduracil enthaltender DNA einen kovalenten Komplex aus Protein und DNA darzustellen. Durch proteolytische Fragmentierung mit anschließender Sequenzierung konnte die DNA-Bindungsstelle bestimmt werden. Wie schon bei anderen DNA Mtasen ist auch bei der Dam DNA-MTase der Tyrosinrest des hoch konservierten NPPY-Motivs an der Ausbildung der kovalenten Bindung



---

beteiligt. Die Identifizierung des Y184 deutet darauf hin, daß dieses konservierte Motiv mit der Zielbase wechselwirkt und ihre extrahelikale Position dadurch stabilisiert wird.

Die genaue Kenntnis sowohl über den Mechanismus der Dam DNA-MTase als auch über ihre Struktur ist von großem Interesse. Die Dam DNA-MTase findet man in zahlreichen pathogenen Bakterien, und kürzlich konnte gezeigt werden, dass *Salmonella typhimurium* bei Abwesenheit der Dam DNA-MTase seine Virulenz verliert. Somit könnte die Kenntnis der Dam DNA-MTase-Struktur die Entwicklung neuer Inhibitoren für Dam DNA-MTasen mit breitem Anwendungsspektrum als Antibiotika erheblich unterstützen.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 Verwendete Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind vom Reinheitsgrad puriss. p.a bzw. p.a und wurden von folgenden Firmen bezogen:

$\lambda$ -DNA (dam <sup>+</sup> dcm <sup>-</sup> )	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Acetonitril für die HPLC	Baker (Deventer, Niederlande)
Acrylamid	Serva (Heidelberg)
S-Adenosyl-L-homocystein	Sigma-Aldrich (München)
S-Adenosyl-L-methionin ( <i>p</i> -Toluolsulfonat)	Sigma-Aldrich (München)
S-Adenosyl-L-methionin (1,4-Butan- disulfonat)	Knoll Bioresearch SA (S. Antonio, Schweiz)
Bisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Bradford-Reagenz (Pierce)	KMF Laborchemie HandelsGmbH (St. Augustin)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA-Eichlösung (Pierce)	KMF Laborchemie HandelsGmbH
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva (Heidelberg)
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DTT	Gerbu (Gaiberg)
EDTA	Fluka (Neu-Ulm)
Essigsäure	Baker (Deventer, Niederlande)
Ethanol	Riedel-de Haën (Seelze)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Glycerin	Fluka (Neu-Ulm)
Kaliumchlorid	Baker (Deventer, Niederlande)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
LMW-Standard	Amersham Biosciences (Freiburg)
Magnesiumchlorid	Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumchlorid	Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumdodecylsulfat	Gerbu (Gaiberg)
Natriumhydroxid	Baker (Deventer, Niederlande)
Phenol	Roth (Karlsruhe)

---

Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva (Heidelberg)
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich (München)
Seleno-Methionin	Sigma-Aldrich (München)
Salzsäure	Baker (Deventer, Niederlande)
Trishydroxymethylamin	Fluka (Neu-Ulm)

### 6.1.2 Proteine

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Boehringer (Mannheim)
Chymotrypsin Sequencing Grade	Roche (Mannheim)
DNase	Roche (Mannheim)
R·MboI	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Polynukleotidkinase (T4 Phage)	New England Biolabs (Beverly, USA)
Trypsin Sequencing Grade	Roche (Mannheim)

### 6.1.3 Zellen und Plasmide

pDOX1	Prof. Wilhelm Guschlbauer (Centre d'Etudes de Saclay, Frankreich)
HB101	Promega (Mannheim)

### 6.1.4 Säulen und Säulenmaterialien

Heparin Sepharose CL-6B	Amersham Biosciences (Freiburg)
Mono Q HR 5/5	Amersham Biosciences (Freiburg)
NAP <sup>TM</sup> -5 (Sephadex G-25M)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Poros HS 50	Perseptive Biosystems (USA)
Prontosil Reversed Phase C18	Bischoff (Leonberg)
Superdex 75	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Biosciences (Freiburg)

**6.1.5 Puffer**

Aufschluß-Puffer	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,5 M NaCl (pH = 7,6), 5 mM DTT, 2 mM PMSF
Coomassie-Lösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 in 45 % (v/v) Methanol
Dam-Reaktionspuffer	150 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH = 8), 2 mM DTT
Dam-Lagerpuffer	50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM EDTA (pH = 7,5), 1 mM DTT, 52,5 % (v/v) Glycerin
Entfärbelösung	5 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure
FPLC-Puffer A	50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA (pH = 7,6), 2 mM DTT, 1 mM PMSF
FPLC-Puffer B	FPLC-Puffer A, 1 M KCl
FPLC-Puffer C	100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin (pH = 7,5), 2 mM DTT
FPLC-Puffer D	FPLC-Puffer C, 1 M KCl
FPLC-Puffer E	100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 20 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin (pH = 7,5), 2 mM DTT
FPLC-Puffer F	6,7 mM Mes, 6,7 mM NaOAc, 6,7 mM HEPES (pH = 6), 10 % (v/v) Glycerin, 300 mM KCl, 0,2 mM DTT
HPLC-Puffer A	0,1 M TEAAc (pH = 7)
HPLC-Puffer B	70 % (v/v) Acetonitril, 30 % (v/v) HPLC-Puffer A (pH = 7)
HPLC-Puffer C	10 mM Tris-HCl (pH = 7,8)
HPLC-Puffer D	10 mM Tris-HCl, 1 M KCl (pH = 7,8)
HPLC-Puffer E	10 mM Tris-HCl, 200 mM KCl (pH = 7,8)
R- <i>Mbo</i> I-Reaktionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA
PNK-Puffer	70 mM Tris-HCl (pH = 7,6), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM DTT
Probenpuffer für Agarosegel	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin
Proteaseverdau-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH = 8,5)
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl (pH = 8,9), 2 mM EDTA, 20 mM DTT, 4 % SDS (w/v), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin

SDS-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 192 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS
SJ-Anodenpuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 8,9)
SJ-Kathodenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH = 8,25), 10 mM Tricin, 0,1 % (v/v) SDS
TAE	200 mM TrisOAc, 5 mM EDTA

### 6.1.6 Medien

AM <sub>3</sub> (Antibiotika Medium 3)	Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg)
LB-Agar	1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar-Agar
LeMaster Medium	nach LeMaster und Richards (1985)
LeMaster B Medium (500 ml)	50 g Glucose; 1,25 g MgSO <sub>4</sub> ; 21 mg FeSO <sub>4</sub> ; 41,5 µl konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 6.1.7 Geräte

Agarose Minigelkammer	MWG Biotech (Ebersberg)
Analysenwaage Sartorius Basic	Sartorius (Göttingen)
Analytische Ultrazentrifuge Optima <sup>TM</sup> XL-A mit scannendem Absorptionsphotometer	Beckman Instruments (Palo Alto, USA)
Bestrahlungsapparatur:	
Quecksilberdampfampe, Basic Power Supply 68806 (50 - 200 Watt),	Oriel (Stratford, USA)
Filter Typ DUG 11(Dicke 2 mm, Ø 50 mm)	Schott Glaswerke
Haake C und F3 Kryostat	
Centricon 10K	Milipore Amicon (Witten)
Centriprep 10K	Milipore Amicon (Witten)
Fluoreszenzspektrophotometer Aminco SLM 8100 und Aminco AB2	Sopra GmbH (Büttelborn)
Gelelektrophoreseapparatur Mini Protean <sup>2</sup>	BioRad (München)
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne (Cambridge)

---

High-Load-System LKB GP-10 mit Pumpe P-50, LKB-UV-M-2-Detektor, Konduktivitätsmonitor, Fraktionssammler Super Frac und LKB-Rec 102 Schreiber	Amersham Biosciences (Freiburg)
HPLC-System Gold, Pumpensystem 125, Dioden- Array-Detector-Modul 168, Analog-Interface- Modul 406	Beckmann (München)
Jumbo Sep	Pall Filtron
Microcon 10K und 3K	
Microfluidizer	Microfluidics Cooperation (Newton, USA)
Minioven MK II	Hybaid (Teddington, UK)
Netzgerät BioRad Power Pac 300	BioRad
Netzgerät BioRad Power Pac 3000	BioRad
Netzgerät Pharmacia LKB ECPS 3000/150	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Polaroid Kamera MP4+	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Speed Vac SC 110-A	Faust (Bochum)
Stopped Flow Multit-Mixing Spectrofluorimeter SF-61MX mit IS-2 Rapid Kinetics	
Software (V 2.3b6)	High Tech Scientific (Salisbury, USA)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin (Berlin)
UV-Visible-Spectrophotometer Cary 3E	Varian (Darmstadt)
UV-Visible-Spectrophotometer DU 650	Beckman
Waage: Mettler P1200	Mettler (Gießen)
Voyager-DE Pro, BioSpectrometry Workstation	Perseptive Biosystems (Weiterstadt)
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf (Köln)
Zentrifuge J2-HC, J2-HS und L8-70 mit Rotoren JS-4.3, JA-10, JA-17, TI-45 und TI-70	Beckmann (München)

## 6.2 Verwendete ODN

### 6.2.1 ODN und ihre Abkürzungen

Die verwendeten unmodifizierten ODN wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und die modifizierten von der Firma IBA GmbH (Göttingen) bezogen. Sofern sie nicht lyophilisiert waren, wurde dieses mittels Speed Vac durchgeführt. Bei Bedarf wurden sie über eine NAP5-Säule entsalzt und in H<sub>2</sub>O bei -20°C gelagert.

#### a) Für biophysikalische Arbeiten verwendete ODN

**Tabelle 2:** Für biophysikalische Arbeiten verwendete ODN und ihre Abkürzungen

Abkürzung	Sequenz <sup>a</sup>
DamP18	5'-GCT CAC GGA TCT AAG ACG-3'
DamP(A2Ap)18	5'-GCT CAC GGAp TCT AAG ACG-3'
DamP(A2delta)18	5'-GCT CAC GGΔ TCT AAG ACG-3'
DamP(A2I)18	5'-GCT CAC GGI TCT AAG ACG-3'
DamM18	5'-CGT CTT AGA TCC GTC AGC-3'
DamM(A2M)18	5'-CGT CTT AGA <sup>Me</sup> TCC GTC AGC-3'
Dam18HP	5'-GCT CAC GGI TCT AAG ACG 3'-CGA GTG CCT IGA TTC TGC

<sup>a</sup> Die folgenden Abkürzungen werden für die modifizierten Nukleotide verwendet:

A<sup>Me</sup> = 6-Methyl-2'-desoxyadenosin, 2-Ap = 2-Aminopurin-2'-desoxyribosid, I = 5-Iod-2'-desoxyuridin, Δ = 1,2-Didesoxyribose.

## b) Für kristallographische Arbeiten verwendete ODN

**Tabelle 3:** Für kristallographische Arbeiten verwendete ODN und ihre Abkürzungen

Abkürzung	Sequenz <sup>a</sup>
DamP12	5'-GCA GGA TCT ACG-3'
DamP12Br	5'-GCA GGA BrCBr ACG-3'
DamP12I	5'-GCA GGA ICI ACG-3'
DamM12	5'-CGT AGA TCC TGC-3'
DamM(A2M)12	5'-CGT AGA <sup>Me</sup> TCC TGC-3'
DamM12Br	5'-CGBr AGA BrCC BrGC-3'
DamM(A2M)12Br	5'-CGBr AGA <sup>Me</sup> BrCC BrGC-3'
DamM12I	5'-CGI AGA ICC IGC-3'

<sup>a</sup> Die folgenden Abkürzungen werden für die modifizierten Nukleotide verwendet:

A<sup>Me</sup> = 6-Methyl-2'-desoxyadenosin, I = 5-Iod-2'-desoxyuridin, Br = 5-Brom-2'-desoxyuridin

Δ = 1,2-Didesoxyribose.

## 6.3 Chromatographische Methoden

### 6.3.1 Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Anionenaustauscher-Chromatographie wird mit dem Beckmann System Gold durchgeführt. Für die Anionenaustauscher-Chromatographie wird eine Mono Q-Säule verwendet. Die Pufferlösungen werden vor Gebrauch filtriert und zusätzlich über einen Zeitraum von 15 min im Ultraschallbad entgast. Die auf die Säule aufgetragene Probe wird im verwendeten HPLC-Startpuffer aufgenommen.

### 6.3.2 Analytische Gelfiltrations-Chromatographie

Die analytische Gelfiltrations-Chromatographie wird an dem Beckmann System Gold durchgeführt. Das System besteht aus dem programmierbaren Lösungsmittel-Modul 125 (Pumpensystem), einem Dioden-Array-Detektor Modul 168 (UV-Detektor) und einem



Shimadzu RF-535 Fluoreszenzdetektor. Als Interface für den Fluoreszenzdetektor dient das Analog-Interface-Modul 406. Für die Gelfiltrations-Chromatographie wird eine analytische Gelfiltrationssäule (Superdex 200 HR 10/30) verwendet. Die Pufferlösungen werden vor Gebrauch filtriert und zusätzlich über einen Zeitraum von 15 min im Ultraschallbad entgast. Die auf die Säule aufgetragene Probe wird im verwendeten HPLC-Startpuffer aufgenommen. Gemessen wird die Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm.

### 6.3.3 HPLC-Bedingungen

Die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (*reversed phase* HPLC) wird mit dem Beckmann System Gold durchgeführt. Die HPLC-Anlage besteht aus dem programmierbaren Lösungsmittel-Modul 125 (Pumpensystem), einem Dioden-Array-Detektor Modul 168 (UV-Detektor) und einem Shimadzu RF-535 Fluoreszenzdetektor. Als Interface für den Fluoreszenzdetektor dient das Analog-Interface-Modul 406. Die für die Reinigung verwendeten Säulentypen sind im Text aufgeführt. Generell wird für analytische Läufe eine ProntoSil Reversed-Phase-Säule der Firma Bischoff verwendet. Die HPLC-Pufferlösungen werden vor Gebrauch filtriert und zusätzlich über einen Zeitraum von 15 min im Ultraschallbad entgast. Die auf die Säule aufgetragene Probe wird im verwendeten HPLC-Startpuffer aufgenommen und vor der Auftragung auf die Säule mikrofiltriert. Detektion erfolgt UV-spektroskopisch bei 260 nm und 280 nm.

### 6.3.4 FPLC-Bedingungen

Für die Fast-Protein-Liquid-Chromatographie (FPLC) wird das High-Load-System LKB GP-10 mit der Pumpe P-50, dem LKB-UV-M-2-Detektor, einem Leitfähigkeitsmeßgerät und dem LKB-Rec 102 Schreiber der Firma Amersham Biosciences (ehemals Pharmacia Biotech) verwendet. Sämtliche Aufreinigungen mit diesem System werden bei 4°C durchgeführt. Die eingesetzten Säulen sind zum einen eine Kationenaustauschersäule (Poros HS 50) der Firma Perseptive Biosystems, eine Heparinsäule (Heparin Sepharose CL-6B) und eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75) der Firma Amersham Biosciences (ehemals Pharmacia Biotech). Die FPLC-Pufferlösungen werden vor Gebrauch filtriert und zusätzlich über einen Zeitraum von 15 min im Ultraschallbad entgast.

## 6.4 Molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten

### 6.4.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von längeren DNA-Fragmenten wird eine Elektrophorese in 1 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer unter Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Es werden 1 µg einer DNA-Lösung mit 1/6 Volumenäquivalenten Agaroseprobenpuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei 90 V für 60 min. Die DNA wird anschließend mittels eines UV-Transilluminators bei 312 nm sichtbar gemacht und das Gel mit einer Polaroidkamera dokumentiert. Als Längenstandard dienen 0,5 µg mit *BstE* fragmentierter λ-DNA.

### 6.4.2 Ausplattieren rekombinanter *E. coli*-Zellen

Jeweils 10 µl und 50 µl eines Glycerinstocks von HB101/pDOX1 werden auf einer mit Ampicillin (100 mg/l) versehenen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert.

### 6.4.3 Expression der Dam DNA-MTase in *E. coli*

Zur Vermehrung der rekombinanten *E. coli*-Zellen HB101/pDOX1 werden 2 ml 2 x AM<sub>3</sub>-Medium mit 2 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und als Tageskultur bei 30°C geschüttelt. Mit der gewachsenen Tageskultur werden anschließend 200 ml 2 x AM<sub>3</sub>-Medium mit 20 µl Ampicillin (100 mg/ml) angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt.

Fünf vorgewärmte 5 l-Kolben mit jeweils 1000 ml 2 x AM<sub>3</sub>-Medium und 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) werden mit jeweils 40 ml der Vorkultur versetzt und bei 30°C geschüttelt. In der Zwischenzeit werden die restlichen 5000 ml 2 x AM<sub>3</sub>-Medium auf 60°C vorgewärmt. Zur Induktion der Expression der Dam DNA-MTase wird die Kultur bei einer OD<sub>600 nm</sub> von 1,2 mit jeweils 1000 ml des vorgewärmten 2 x AM<sub>3</sub>-Mediums versetzt, zuzüglich 1 ml Ampicillin (100 mg/ml), und für 1 h bei 42°C geschüttelt. Danach wird auf 37°C abgekühlt und für 2 h geschüttelt. Anschließend werden die Zellen bei 5000 g innerhalb von 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden bei -20°C gelagert.

#### 6.4.4 Reinigung der Dam DNA-MTase

Die Reinigung der Dam DNA-MTase wird aufgrund der Temperaturempfindlichkeit des Proteins vollständig bei 4°C durchgeführt. Die bei -20°C gelagerten Zellen (ca. 50 g aus 10 l Schüttelkultur) werden aufgetaut und in insgesamt 250 ml Aufschluß-Puffer suspendiert. Zu dieser Suspension fügt man eine Spatelspitze DNase hinzu und inkubiert sie unter Rühren einige Minuten. Mittels eines Microfluidizers werden die Zellen geöffnet, wobei dieser Vorgang dreimal wiederholt wird. Anschließend wird die Suspension 30 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird tropfenweise mit insgesamt 1/100 Volumenäquivalenten einer Polyethylenimin-Lösung (10 %) versetzt und die DNA durch 15-minütiges Rühren gefällt. Nach der Fällung wird die Suspension innerhalb von 30 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird 1:5 mit FPLC-Puffer A verdünnt und auf eine Kationenaustauschersäule aufgetragen. Die erste Reinigung erfolgt mittels FPLC unter folgenden Bedingungen:

Säule:	Poros HS 50 (1,8 x 8 cm, 20 ml)
Laufmittel:	Puffer A: FPLC-Puffer A Puffer B: FPLC-Puffer B
Gradient:	5 SV mit 10 % B waschen von 10 % B auf 100 % B in 5 SV
Flußrate:	10 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 280 nm Konduktivität

Von ausgewählten Fraktionen wird die Proteinkonzentration durch Bradford-Test bestimmt und die Fraktionen zusätzlich mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) überprüft. Die Dam DNA-MTase enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mit FPLC-Puffer C 7-fach verdünnt und auf eine Heparin Säule aufgetragen. Die Reinigung erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Säule:	Heparin Sepharose CL-6B (1,8 x 7,3 cm, 15 ml)
Laufmittel:	Puffer A: FPLC-Puffer C Puffer B: FPLC-Puffer D
Gradient:	5 SV mit 0 % B waschen von 0 % B auf 100 % B in 10 SV 2 SV mit 100 % B waschen

---

	von 100 % B auf 0 % B in 1 SV
	4 SV mit 0 % B waschen
Flußrate:	1 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 280 nm
	Konduktivität

Von ausgewählten Fraktionen wird die Proteinkonzentration durch Bradford-Test bestimmt und der Gehalt an Dam DNA-MTase zusätzlich durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) überprüft. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mittels Ultrazentrifugation (Centriprep 10 K) auf ein Volumen von 5 ml aufkonzentriert. Das Konzentrat wird anschließend einer Gelfiltration (Superdex 75, 2,6 x 60 cm, 320 ml, FPLC-Puffer E; Flußrate 1 ml/min) unterzogen. Von ausgewählten Fraktionen wird erneut die Proteinkonzentration bestimmt und die Fraktionen zusätzlich durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) überprüft. Die Dam DNA-MTase enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und zur Cofaktorentfernung erneut auf eine Kationenaustauschersäule (Poros HS 50, 1,8 x 8 cm, 20 ml, Fluß 10 ml/min) aufgetragen und mit 9000 ml FPLC-Puffer F gewaschen. Die Elution der Dam DNA-MTase erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Säule:	Poros HS 50 (1,8 x 8 cm, 20 ml)
Laufmittel:	Puffer A: FPLC-Puffer C Puffer B: FPLC-Puffer D
Gradient:	3,75 SV mit 10 % B waschen von 10 % B auf 100 % B in 3,75 SV 4 SV mit 100 % B waschen
Flußrate:	10 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 280 nm Konduktivität

Mittels Bradford-Test und SDS-PAGE werden die Dam DNA-MTase enthaltenden Fraktionen ermittelt und vereinigt. Die Dam DNA-MTase wird durch Ultrazentrifugation (Centriprep 10 K) aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Protein-Lösung wird mit dem gleichen Volumen Glycerin (100 %) versetzt und bei -20°C gelagert.

#### 6.4.5 Aktivitätstest für die Dam DNA-MTase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 0,1 mg/ml  $\lambda$ -DNA ( $\text{dam}^- \text{dcm}^-$ ) und 80  $\mu\text{M}$  AdoMet mit 2, 3,9, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500 und 1100 ng/ml Dam DNA-MTase in Dam-Reaktionspuffer hergestellt und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Lösungen werden dann mit jeweils 30  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 4,5 U *cMboI* und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  in *R·MboI*-Reaktionspuffer innerhalb von 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10  $\mu\text{l}$  Agaroseprobenpuffer versetzt. Je 12  $\mu\text{l}$  der einzelnen Proben werden auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch analysiert. Im allgemeinen ist die DNA ab einer Enzym-Konzentration von 62,5 ng/ml vor der Fragmentierung durch *R·MboI* vollständig geschützt.

#### 6.4.6 AdoMet-Detektion

Zur Bestimmung der Menge an AdoMet, die an der Dam DNA-MTase gebunden ist, werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 0,1 mg/ml  $\lambda$ -DNA ( $\text{dam}^- \text{dcm}^-$ ) in Dam-Reaktionspuffer mit einem, zwei, u.s.w. bis zehn Äquivalenten Dam DNA-MTase bezogen auf die Anzahl an Dam-Erkennungssequenzen in  $\lambda$ -DNA ( $\text{dam}^- \text{dcm}^-$ ) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Lösungen werden anschließend analog zum Aktivitätstest mit *R·MboI* behandelt. Der Gehalt an AdoMet wird durch Bestimmung des stöchiometrischen Überschusses an Dam DNA-MTase, bei der die  $\lambda$ -DNA nicht mehr geschnitten wird, ermittelt. Die gereinigte Dam DNA-MTase enthält im allgemeinen kein AdoMet.

#### 6.4.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit der Methode nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen werden im allgemeinen nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode bestimmt. Je nach Proteinkonzentration (1 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) werden 1 - 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit Dam-Reaktionspuffer auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 900  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wird die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Eichgerade berechnet.

#### **6.4.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit Hilfe eines denaturierenden Gelsystems nach Laemmli (1970). Die Polymerisation der aus 15 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 0,1 % SDS und 375 mM Tris-HCl (pH = 8,8) bestehenden Lösung wird unter Zugabe von 14  $\mu\text{mol}$  TEMED und 0,5 mg APS pro ml gestartet und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach Überschichten dieses Trenngels mit Isopropanol und vollständiger Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel bestehend aus 7,5 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 0,1 % SDS, 125 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 14  $\mu\text{mol}$  TEMED und 0,8 mg APS pro ml überschichtet und in Gegenwart eines Kammes, der in die Gelkammer geschoben wird, polymerisiert. Die Proteinlösung wird im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und nach Abkühlen in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 mA in SDS-Puffer.

#### **6.4.9 Schägger-Jagow-Polyacrylamidgelelektrophorese (SJ-PAGE)**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleopeptidgemischen bis zu einer Größe von 20 kDa wird in einem Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt. Eine Lösung aus 16 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 300 mM Tris-HCl (pH = 8,45), 0,03 % SDS, 14  $\mu\text{mol}$  TEMED und 0,5 mg APS pro ml wird in eine Novex-Gelkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation und Entfernen des Isopropanols wird das Trenngel mit einem Sammelgel, das aus 4 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 300 mM Tris-HCl (pH = 8,45), 0,03 % SDS, 14  $\mu\text{mol}$  TEMED und 0,8 mg APS pro ml besteht, überschichtet und die Polymerisation in Gegenwart eines in die Gelkammer eingesetzten Kamms durchgeführt. Die Protein-DNA-Lösung wird mit SDS-Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Die Gelelektrophorese wird bei 100 V in SJ-Kathodenpuffer und SJ-Anodenpuffer durchgeführt.

#### **6.4.10 Coomassie-Färbung**

In einem Gel getrennte Proteine werden mit Coomassie-Blau-Reagenz angefärbt. Dazu wird das Gel ca. 30 min in einer Coomassie-Lösung angefärbt und anschließend der nicht an Proteine gebundene Farbstoff durch Schütteln in 10 %-iger Essigsäure entfernt. Die Gele

werden anschließend auf Whatmanpapier gelegt und mit einem Gelrockner im Vakuum getrocknet.

#### **6.4.11 Hybridisierung von komplementären ODN**

Äquimolare Mengen an komplementären ODN werden in Dam-Reaktionspuffer aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen liegen zwischen 20  $\mu\text{M}$  und 1500  $\mu\text{M}$ .

Für Fluoreszenztitrationen wird das entsprechende ODN mit einem 1,1-fachen Überschuß an komplementärem methyliertem Gegenstrang in Dam-Reaktionspuffer aufgenommen.

Die Hybridisierung erfolgt durch Erwärmen der Lösungen für 2 min im Heizblock auf 95°C und anschließendes langsames Abkühlen des Heizblocks auf RT.

#### **6.4.12 Darstellung der Dam DNA-MTase-Vernetzungs-Produkte**

Für die Vernetzungs-Experimente zwischen Dam DNA-MTase und der Hairpin DNA Dam18HP im analytischen Maßstab wird eine Lösung aus 2  $\mu\text{M}$  radioaktiv markiertem Hairpin mit 4  $\mu\text{M}$  Dam DNA-MTase in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  AdoMet in 500  $\mu\text{l}$  Dam-Reaktionspuffer aufgenommen. Die Bestrahlung wird bei 3°C in einer QS Quarzküvette (1 cm) mit einer Quecksilber-Dampflampe durchgeführt. Zur Minimierung von lichtinduzierten Schädigungen des Enzyms und der DNA wird ein Interferenzfilter (Bandbreite 300 - 380 nm) verwendet. In Abständen von 30 min wird jeweils weitere Dam DNA-MTase zusätzlich zu der Lösung hinzugegeben, so dass nach 90 min ein 8-facher Überschuß an Dam DNA-MTase vorliegt. Zur Verfolgung des Reaktionsfortschritts werden jeweils 20  $\mu\text{l}$  Proben nach bestimmten Bestrahlungszeiten entnommen, SJ-PAGE aufgetrennt und mit einem Phosphoimager analysiert.

Vernetzungs-Experimente im präparativen Maßstab werden in einer Lösung aus Dam-Reaktionspuffer (500  $\mu\text{l}$ ) mit 50  $\mu\text{M}$  Dam18HP und einem 1- bis 10-fachen Überschuß an Dam DNA-MTase (50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  AdoMet durchgeführt. Der Reaktionsfortschritt der Bestrahlung wird mittels Gelfiltrations-Chromatographie oder SDS-PAGE analysiert und die Produkte durch Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt.

Vernetzungs-Experimente zwischen Duplex-ODN DamP18h (60  $\mu$ M) und 2-fachem Überschuß an Dam DNA-MTase werden in 700  $\mu$ l Dam Reaktionspuffer in Gegenwart von 350  $\mu$ M AdoMet durchgeführt. Nach 100 min Bestrahlung wird das Produkt mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Vernetzungs-Produkte werden bei 4°C gelagert.

#### **6.4.13 Analyse der Vernetzungs-Experimente mittels Gelfiltrations-Chromatographie**

Der Reaktionsfortschritt der Bestrahlung von Hairpin DNA Dam18HP mit Dam DNA-MTase wird unter nativen Bedingungen mittels Gelfiltrations-Chromatographie analysiert. Dafür werden zu bestimmten Zeiten jeweils 50  $\mu$ l Proben entnommen, auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und unter folgenden Bedingungen analysiert:

Säule:	Superdex 200 HR10/30 (1 x 30 cm, 24 ml)
Laufmittel:	HPLC-Puffer E
Gradient:	isokratisch 1 SV
Flußrate:	0,2 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm

#### **6.4.14 Aufreinigung der Vernetzungs-Produkte mittels Anionenaustauscher-Chromatographie**

Die Aufreinigung der durch die Bestrahlung von Hairpin DNA oder Duplex-ODN und Dam DNA-MTase dargestellten Produkte wird mittels Anionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt. Dazu werden folgende Bedingungen verwendet:

Säule:	Mono Q HR 5/5 (0,5 x 5 cm, 1 ml)
Laufmittel:	Puffer A: HPLC-Puffer C Puffer B: HPLC-Puffer D
Gradient:	5 SV mit 20 % B waschen von 20 % B auf 100 % B in 25 SV



---

	15 SV mit 100 % B waschen
	von 100 % B auf 20 % B in 2 SV
Flußrate:	1 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm

Die gereinigten Vernetzungs-Produkte werden anschließend mittels Microcon 10K aufkonzentriert, in 10 mM Tris-HCl (pH = 7,8) umgepuffert und bei 4°C gelagert.

#### **6.4.15 Proteolytische Fragmentierung des Vernetzungs-Produkts**

Durch enzymatischen Abbau des Proteins im kovalenten Komplex aus Duplex-ODN DamP18h und Dam DNA-MTase mit Proteasen sollen an die DNA gebundene Peptide identifiziert und durch deren Sequenzierung die Aminosäure, die die kovalente Bindung zur DNA ausbildet, bestimmt werden. Aus Überlegungen bezüglich der jeweiligen Schnittstellen im Protein, wurden Trypsin und Chymotrypsin als Proteasen gewählt. Die lyophilisierten Proteasen werden unmittelbar vor dem Ansetzen der Fragmentierung in 1 mM HCl-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst und bei 4°C gelagert. Für die Fragmentierung werden 54 µg des Vernetzungs-Produkts zunächst mit 2,6 µg Trypsin Sequencing Grade in 100 µl Proteaseverdau-Puffer gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden zu dieser Lösung 2,6 µg Chymotrypsin Sequencing Grade und 10 µl CaCl<sub>2</sub> (100 mM) hinzugefügt und weitere 5 h bei RT inkubiert. Zur Analyse der Fragmentierung werden 10 µl der Lösung radioaktiv markiert. Mittels SJ-PAGE werden die Nukleopeptidkonjugate aufgetrennt und mit einem Phosphoimager visualisiert.

Die restliche Menge wird mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt (siehe 6.4.14). Das gereinigte Peptid-DNA-Fragment wird anschließend mittels eines Microcons 3 K aufkonzentriert und in 10 mM Tris-HCl (pH = 7,8) umgepuffert.

#### **6.4.16 Radioaktive DNA-Markierung**

Zur Analyse der lichtinduzierten Vernetzungs-Reaktion und proteolytischen Fragmentierung des Vernetzungs-Produkts durch SJ-PAGE wird das 5'-Ende der Hairpin-DNA bzw. des kovalent gebundenen ODNs mit radioaktivem Phosphat markiert. Für die Markierung des

gebundenen ODNs werden 170 pmol Fragmentierungsprodukt bzw. als Kontrolle das entsprechende ODN DamP(A2I)18 und unbehandelter DNA-Dam-Komplex in jeweils 15  $\mu$ l PNK-Puffer mit 2  $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (2 pmol, 3000 Ci/mmol) und 1,5  $\mu$ l T4 Polynukleotid Kinase (15 U) versetzt. Die Lösungen werden 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf 65°C erwärmt.

#### 6.4.17 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung erfolgt durch Edman-Abbau und wurde am Zentrum für molekulare Medizin in Köln durchgeführt.

## 6.5 Biophysikalische Methoden

### 6.5.1 Fluoreszenzspektrometrische Methoden

Fluoreszenzmessungen werden mit dem Aminco AB2 Fluoreszenzspektrometer mit Hilfe eines thermostatisierbaren Küvettenhalters bei einer Temperatur von 3°C durchgeführt. Anregungs- und Emissionsspektren sowie Titrations werden bei  $\lambda_{\text{Excitation}} = 320$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} = 381$  nm mit einer Bandbreite von 1 nm für die Anregungsstrahlung und 16 nm für die Emissionsstrahlung aufgenommen.

### 6.5.2 UV-VIS-Spektroskopie

Die Messung der OD von ODN oder Proteinen erfolgt in einer Quarzküvette QS (Schichtdicke  $d = 1$  cm) mit dem UV-VIS-Spektralphotometer Cary 3E der Firma Varian oder mit dem UV-VIS-Spektralphotometer DU 650 der Firma Beckman. Im allgemeinen wird für ODN bei  $\lambda = 260$  nm und für Proteine bei  $\lambda = 280$  nm gemessen. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten der ODN sind in Tabelle 3 aufgeführt und wurden mit Hilfe der *nearest-neighbour* Methode (Cantor *et al.*, 1970) berechnet. Dazu wurde das im Internet vorliegende Programm Oligo Analyzer 2.5 der Firma Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, USA, verwendet ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)).

**Tabelle 4:** Berechnete molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten ODN

<b>Oligodesoxynukleotid</b>	<b><math>\epsilon / 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}</math></b>
DamP18	1,760
DamP(A2Ap)18	1,644
DamP(A2delta)18	1,634
DamP(A2I)18	1,640
DamP12	1,186
DamP12Br	1,176
DamP12I	1,030
Dam18HP	3,232
DamM18	1,688
DamM(A2M)18	1,519
DamM12	1,108
DamM(A2M)12	1,108
DamM12Br	0,935
DamM(A2M)12Br	0,919
DamM12I	0,854

Für die Dam DNA-MTase wird ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 37400 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Marzabal *et al.*, 1995) verwendet.

### 6.5.3 Stopped-Flow Messungen

Die *Stopped-Flow* Messungen werden am SF-61MX Multi-Mixing-Spectrofluorimeter der Firma High Tech Scientific in Dam-Reaktionspuffer bei 5°C durchgeführt. Die Anregung erfolgt mit einer Hg-Xe-Lampe bei 312 nm und für die Emission wird ein Cut-Off-Filter WG 360 (2 mm Schichtdicke), der im wesentlichen nur Licht der Wellenlänge größer 360 nm durchlässt, verwendet. Die Verstärkerleistung durch den Photomultiplier wird nach mehrmaligem Spülen der Reaktionskammer mit Fluorophorlösung und durch drei Blindschüsse auf eine Signalstärke von ca. -1 Volt eingestellt.

#### **6.5.4 Analytische Ultrazentrifugation**

Die analytischen Ultrazentrifugationsexperimente werden unter Gleichgewichtsbedingungen an der Medizinischen Hochschule Hannover von Prof. Dr. Claus Urbanke durchgeführt. Hierfür wird eine analytische Ultrazentrifuge (Optima<sup>TM</sup> XL-A, Beckman Instruments) verwendet, die mit einem scannenden, ortsauflösenden Absorptionsphotometer ausgestattet ist. Da die Experimente bei 3°C durchgeführt werden, werden Rotor und Küvetten zuvor gekühlt.

Für die einzelnen Messungen werden jeweils 120 µl Lösungen von verschiedenen Stöchiometrien (bis zu einem 10-fachen Dam DNA-MTase Überschuß) von Duplex-ODN DamP(A2Ap)18h und Dam DNA-MTase in Dam-Reaktionspuffer mit nur 0,1 mM DTT angesetzt und bei 22000 rpm zentrifugiert.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm AKKUPROG bzw. seinem Nachfolger BPCFIT. Die Grundlage einer Auswertung ist die Berechnung der Daten durch ein mathematisches Modell und die Anpassung der Parameter des Modells mit dem Ziel einer möglichst guten Übereinstimmung von Modellrechnung und Messung.

#### **6.5.5 MALDI-Massenspektrometrie**

Die gereinigten und in 10 mM Tris-HCl, pH = 7,8, umgepufferten Vernetzungs-Produkte werden für die massenspektrometrische Analyse auf Sinapinsäure-Matrix aufgetragen (jeweils 1 µl) oder 10-fach bzw. 100-fach mit Sinapinsäure-Matrix verdünnt. Als Matrix wird eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in 50 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA verwendet. Die Messungen werden an einer MALDI-TOF Voyager<sup>TM</sup>-DE PRO Biospectrometry Workstation durchgeführt. Die erhaltenen Massen werden anschließend durch Kalibrierung mit einer Standardprobe korrigiert.

## 6.6 Kristallographische Arbeiten

### 6.6.1 Silanisieren der Deckgläser

Die zu silanisierenden Deckgläser werden in einem Teflonhalter fixiert und anschließend zweimal abwechselnd mit Wasser (400 ml, 20 min) und Ethanol (technisch, 400 ml, 20 min) gewaschen. Danach werden die Deckgläser bei 60°C getrocknet und mit einer Dichlordimethylsilan-Lösung (2 %-ig in Toluol, 500 ml, 20 min) behandelt. Im Anschluß wird erneut mit Wasser (400 ml, 20 min) und Ethanol (technisch, 400 ml, 20 min) gewaschen. Die erneut bei 60°C getrockneten Deckgläser werden anschließend in eine Metallhülle überführt und über Nacht im Ofen (150°C, 18 h) erhitzt.

### 6.6.2 Kristallisationsansätze und Kristallisationsbedingungen

Für die Kristallisation wird ausschließlich die Methode des hängenden Tropfens in Linbro Zellkulturschalen verwendet. Zunächst werden die Ränder der Vertiefungen in den Schalen mit Silikon (Baysilone-Paste, mittelviskos, Bayer AG) eingefettet. In die Vertiefungen werden dann jeweils 1 ml der zuvor angesetzten Reservoirlösung pipettiert. Auf jedes einzelne Deckgläschen gibt man anschließend zunächst 2 µl Reservoirlösung bzw. *Seedlösung* und pipettiert dann dazu 2 µl Proteinlösung. Nach mehrmaligen Auf- und Abpipettieren des Tropfens wird das Deckgläschen mit dem Tropfen nach innen liegend auf den Rand der Vertiefung gesetzt und vorsichtig angedrückt, so dass der Gasraum abgeschlossen ist. Für die Herstellung von Kristallen der Dam DNA-MTase in Gegenwart von DNA werden die in Tabelle 2 aufgelisteten Oligodesoxynukleotide getestet. Zusätzlich werden die einzelnen Kristallisationsbedingungen getestet. Basierend auf den Analysen von Jancarik & Kim (1991) wurden von der Firma Hampton Research verschiedene *crystal screens* entwickelt, die sich in Gehalt und Konzentration an verschiedenen Fällungsmitteln, Salzen, Additiven und Puffersystemen sowie auch pH-Werten unterscheiden. Die ersten Kristalle des Komplexes aus DNA und Dam DNA-MTase wurden mit dem Hampton Screen II, Lösung Nr. 26 erhalten. Diese Lösung besteht aus 30 % PEG 5000 Monomethylether, 0,1 M Mes, pH 6,5 und 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ausgehend von den Kristallisationsbedingungen bei denen die ersten Kristalle erhalten wurden, wurden die Bedingungen weiter optimiert, indem folgende Parameter variiert

wurden: pH-Wert, Fällungsmittel-, Salz-, Pufferkonzentrationen, Temperatur und Animpfen. Desweiteren wurden auch verschiedene Cofaktoranaloge getestet. Insgesamt wurden ca. 3000 Kristallisationsansätze durchgeführt.

Für die Herstellung des binären Kristalls aus Dam DNA-MTase und DamP12h sind folgende Lösungen eingesetzt worden:

Proteinlösung:	Dam DNA-MTase	(375 $\mu$ M)
	DamP12h	(900 $\mu$ M)
	Tris-HCl pH 8	(150 mM)
	EDTA	(10 mM)
	DTT	(2 mM)
Reservoirlösung:	PEG 5000 MME	(verschiedene Konzentrationen von 10 % bis 35 %)
	Mes	(100 mM, pH-Werte von 4,5 bis 7,5)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(200 mM)

Die Kristalle wuchsen innerhalb von 2-3 Tagen bei 20°C. Große einzelne Kristalle konnten nur durch Animpfen mit bereits vorhandenen Kristallen gezüchtet werden.

### 6.6.3 Kristallmontage

Der Einzelkristall des Komplexes aus Dam DNA-MTase und doppelsträngiger DNA wird mit Hilfe einer kleinen Nylonschleife aus dem Ansatztropfen gefischt und blitzartig in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Für ein homogenes und glasartiges Gefrieren der den Kristall umgebenden Mutterlauge werden zu dem Ansatztropfen (ca. 4  $\mu$ l) zunächst 10  $\mu$ l Stabilisierungslösung bestehend aus 31 % (w/v) PEG 5000 MME, 100 mM Mes-NaOH (pH = 6,2), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zupipettiert. Zur Bestimmung des Phasendatensatzes werden verschiedene Einkristalle vor dem Einfrieren in Lösungen verschiedener Schwermetallverbindungen (gelöst in Stabilisierungspuffer) überführt und für 90 min bis zu 24 h darin gelagert.

#### **6.6.4 Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten**

Die Aufnahme der Röntgendiffraktionsdaten erfolgt unter Cryobedingungen bei 10 0K. Diese Aufnahmen wurden von Prof. Dr. Axel Scheidig durchgeführt.

Für eine erste Qualitätseinschätzung der Kristalle werden diese vorgetestet. Hierfür wird die Röntgenstrahlung mit Hilfe einer Kupferdrehanode (Enraf-Nonius) erzeugt, mit einem Osmic-Spiegel (OSMIC) auf den Kristall fokussiert und das Beugungsbild mit einem MAR345 Phosphor-Bildplatten-Detektor (MarResearch, Hamburg) aufgenommen. Ein kompletter Datensatz der gut streuenden Einkristalle wurde anschließend am europäischen Elektronensynchrotron (ESRF) in Grenoble, Frankreich, an den Mess-Stationen ID14 oder ID29 aufgenommen.

## 7 ANHANG

### 7.1 Auswertung der Bindung der Dam DNA-MTase an DNA mit einer *Global-fit*-Prozedur

Bei der Bindung von zwei Molekülen Dam DNA-MTase an die DNA können entweder die beiden Dam DNA-MTase Moleküle auf der DNA dimerisieren oder zunächst in Lösung ein Dimer bilden, welches dann an die DNA bindet. Zur Auswertung der Fluoreszenztitrationen werden daher beide Modelle getestet. Die Auswertung dieser Daten erfolgt mit der *Global-fit*-Prozedur.

#### 7.1.1 Gleichungsdatei für die schrittweise Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA

Die Änderungen der 2-Ap-Fluoreszenz wird in Abhängigkeit von der Dam DNA-MTase-Konzentration für alle fünf verwendeten ODN-Konzentrationen in einer Gleichungsdatei beschrieben. Dabei wird dem Modell die schrittweise Bindung zweier Moleküle Dam DNA-MTase an die DNA zugrundegelegt. Die Datei enthält außerdem die Anfangsbedingungen, wie z.B. Konzentrationen, Anfangsfluoreszenzen und Amplitudenwerte, sowie Schätzwerte für zu berechnende Parameter. Nach Festlegung der Parameter kann jeder Parameter während der Abweichungsminimierung variiert werden oder konstant gehalten werden. Die Daten der Fluoreszenztitrationen werden mit dem Programm *Scientist* ausgewertet. Im folgenden ist die verwendete Gleichungsdatei dargestellt:

```
// Global Fit von 2-Ap-Titration mit Dam
// A (fluoreszierendes Substrat)
// Reaktion E+A <> EA : KdA - 2-Ap-Fluoreszenz
//      EA + E <> EEA : KdAA
// Signal auf EA und EEA
// Markiertes Oligo: A0
// Zutitrieren von Enzym E
```

IndVars: E0



DepVars: A1, A2, A3, A4, A5, F1, F2, F3, F4, F5, EA1, EA2, EA3, EA4, EA5, EEA1, EEA2, EEA3, EEA4, EEA5, E1, E2, E3, E4, E5

Params: KdA, KdAA, offset1, offset2, offset3, offset4, offset5, A01, A02, A03, A04, A05, yieldX, yieldY

// Gleichungen

// Gleichgewicht

$$EA1 = (A1 * E1) / KdA$$

$$EEA1 = (E1 * EA1) / KdAA$$

$$EA2 = (A2 * E2) / KdA$$

$$EEA2 = (E2 * EA2) / KdAA$$

$$EA3 = (A3 * E3) / KdA$$

$$EEA3 = (E3 * EA3) / KdAA$$

$$EA4 = (A4 * E4) / KdA$$

$$EEA4 = (E4 * EA4) / KdAA$$

$$EA5 = (A5 * E5) / KdA$$

$$EEA5 = (E5 * EA5) / KdAA$$

// Massenerhaltung

$$A01 = A1 + EA1 + EEA1$$

$$E0 = E1 + EA1 + 2 * EEA1$$

$$A02 = A2 + EA2 + EEA2$$

$$E0 = E2 + EA2 + 2 * EEA2$$

$$A03 = A3 + EA3 + EEA3$$

$$E0 = E3 + EA3 + 2 * EEA3$$

$$A04 = A4 + EA4 + EEA4$$

$$E0 = E4 + EA4 + 2 * EEA4$$

$$A05 = A5 + EA5 + EEA5$$

$$E0 = E5 + EA5 + 2 * EEA5$$

// Signal

$$F1 = \text{offset1} + \text{yieldx} * EA1 + \text{yieldy} * EEA1$$

$$F2 = \text{offset2} + \text{yieldx} * EA2 + \text{yieldy} * EEA2$$

$$F3 = \text{offset3} + \text{yieldx} * EA3 + \text{yieldy} * EEA3$$

$$F4 = \text{offset4} + \text{yieldx} * EA4 + \text{yieldy} * EEA4$$

---

$F5 = \text{offset5} + \text{yieldx} * EA5 + \text{yieldy} * EEA5$

// Startbedingungen

KdA=...

KdAA=...

A01=1

A02=0.8

A03=0.6

A04=0.4

A05=0.2

offset1=...

offset2=...

offset3=...

offset4=...

offset5=...

yieldX=...

yieldY=...

// Grenzen

$0 < A1 < A01$

$0 < A2 < A02$

$0 < A3 < A03$

$0 < A4 < A04$

$0 < A5 < A05$

$0 < E1 < E0$

$0 < E2 < E0$

$0 < E3 < E0$

$0 < E4 < E0$

$0 < E5 < E0$

### 7.1.2 Gleichungsdatei für die Bindung der Dam DNA-MTase an die DNA mit vorgelagerter Dimerisierung

Bei der Auswertung der Titrationskurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Dam DNA-MTase an DNA ist auch das Modell einer vorgelagerten Dimerisierung der Dam DNA-MTase verwendet worden. Bei diesem Modell bildet sich in der Lösung zunächst das Dimer aus, das anschließend an die DNA bindet und die Fluoreszenzzunahme bewirkt. Für die Auswertung mit diesem Modell ist die nachfolgende Gleichungsdatei verwendet worden:

```
// Global Fit von 2-Ap-Titration mit Dam
// A (fluoreszierendes Substrat)
// Reaktion E+E <> EE : KdA - 2-Ap-Fluoreszenz
//      EE + A <> EEA : KdAA
// Signal auf EEA
// Markiertes Oligo: A0
// Zutitrieren von Enzym (E)

IndVars: E0
DepVars: A1, A2, A3, A4, A5, F1, F2, F3, F4, F5, EE1, EE2, EE3, EE4, EE5, EEA1, EEA2,
        EEA3, EEA4, EEA5, E1, E2, E3, E4, E5
Params: KdA, KdAA, offset1, offset2, offset3, offset4, offset5, A01, A02, A03, A04, A05,
        yieldY

// Gleichungen
EE1 =(E1*E1)/KdA
EEA1=(EE1*A1)/KdAA
EE2 =(E2*E2)/KdA
EEA2=(EE2*A2)/KdAA
EE3 =(E3*E3)/KdA
EEA3=(EE3*A3)/KdAA
EE4 =(E4*E4)/KdA
EEA4=(EE4*A4)/KdAA
EE5 =(E5*E5)/KdA
EEA5=(EE5*A5)/KdAA
```

---

// Massenerhaltung

$$A01=A1+EEA1$$

$$E0=E1+EE1+2*EEA1$$

$$A02=A2+EEA2$$

$$E0=E2+EE2+2*EEA1$$

$$A03=A3+EEA3$$

$$E0=E3+EE3+2*EEA3$$

$$A04=A4+EEA4$$

$$E0=E4+EE4+2*EEA4$$

$$A05=A5+EEA5$$

$$E0=E5+EE5+2*EEA5$$

// Signal

$$F1=\text{offset1}+\text{yieldy}*EEA1$$

$$F2=\text{offset2}+\text{yieldy}*EEA2$$

$$F3=\text{offset3}+\text{yieldy}*EEA3$$

$$F4=\text{offset4}+\text{yieldy}*EEA4$$

$$F5=\text{offset5}+\text{yieldy}*EEA5$$

// Startbedingungen

$$KdA=...$$

$$KdAA=...$$

$$A01=1$$

$$A02=0.8$$

$$A03=0.6$$

$$A04=0.4$$

$$A05=0.2$$

$$\text{offset1}=...$$

$$\text{offset2}=...$$

$$\text{offset3}=...$$

$$\text{offset4}=...$$

$$\text{offset5}=...$$

$$\text{yieldY}=...$$

---

```
// Grenzen
0<A1<A01
0<A2<A02
0<A3<A03
0<A4<A04
0<A5<A05
0<E1<E0
0<E2<E0
0<E3<E0
0<E4<E0
0<E5<E0
```

## 7.2 Gleichungsdatei zur Auswertung von Verdrängungstitrations

Verdrängungstitrations erlauben die Bestimmung der Affinität eines nicht fluoreszierenden Liganden an ein Enzym, wenn dieser Ligand mit einem fluoreszierenden Liganden um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Die Auswertung dieser Titrations erfolgte mit dem Programm *Scientist*.

### 7.2.1 Gleichungsdatei für kompetitive Titrations mit der Dam DNA-MTase

Zur Auswertung der Titrations eines fluoreszierenden Duplex-ODN in Gegenwart eines nicht fluoreszierenden Duplex-ODN mit der Dam DNA-MTase wurde angenommen, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die jeweilige DNA bindet. Dadurch vereinfacht sich die verwendete Gleichungsdatei zu folgender Form:

```
// Kompetitive Titration von DamP(A2Ap)18h (A) mit unmarkierter DNA (C)
// Fluoreszierendes Substrat: DamP(A2Ap)18h
```

---

// Reaktion  $A+B \rightleftharpoons AB$  : KA-2-Ap Fluoreszenz

//  $B+C \rightleftharpoons BC$  : KB

// Signal auf AB

// Markiertes Oligo A

// Zutitrieren von Dam (B)

IndVars: Bo

DepVars: A, B, AB, CB, C, F

Params: KA, KB, Ao, Co, Ya, Yab

// Gleichungen

// Gleichgewicht

$AB = (A \cdot B) / KA$

$CB = (C \cdot B) / KB$

// Massenerhaltung

$Ao = A + AB$

$Bo = B + AB + CB$

$Co = C + CB$

// Signal

$F = A \cdot Ya + AB \cdot Yab$

// Startbedingungen

KA=...

Ao=0.2

Bo=0

Co=0.4

Ya=...

Yab=...

KB=...

//Grenzen

$0 < A < Ao$

$0 < B < Bo$

$0 < C < Co$

### 7.2.2 Gleichungsdatei für direkte Verdrängungstitrations mit der Dam DNA-MTase

Zur Auswertung der Titrations von Dam DNA-MTase in Gegenwart eines fluoreszierenden Duplex-ODN mit einem nicht fluoreszierenden Duplex-ODN wurde ebenfalls angenommen, dass die Dam DNA-MTase als Dimer an die DNA bindet. Man erhält die folgende Gleichungsdatei:

```
// Verdrängungstitation von DamP(A2Ap)18h (A)/ Dam DNA-MTase (B) mit unmarkierter
  DNA (C)
```

```
// Fluoreszierendes Substrat: DamP(A2Ap)18h
```

```
// Reaktion  $A+B \rightleftharpoons AB$  : KA-2-Ap Fluoreszenz
```

```
//  $B+C \rightleftharpoons BC$  : KB
```

```
// Signal auf AB
```

```
// Markiertes Oligo A
```

```
// Zutitrieren von unmarkierter DNA (C)
```

```
IndVars: Co
```

```
DepVars: A, B, AB, CB, C, F
```

```
Params: KA, KB, Ao, Bo, Ya, Yab
```

```
// Gleichungen
```

```
// Gleichgewicht
```

```
AB=(A*B)/KA
```

```
CB=(C*B)/KB
```

```
// Massenerhaltung
```

```
Ao=A+AB
```

```
Bo=B+AB+CB
```

```
Co=C+CB
```

```
// Signal
```

```
F=A*Ya+AB*Yab
```

```
// Startbedingungen
```

```
KA=0.1
```

```
Ao=0.2
```

$$B_0=1$$

$$C_0=0$$

$$Y_a=1300$$

$$Y_{ab}=2405$$

$$K_B=0.1$$

// Grenzen

$$0 < A < A_0$$

$$0 < B < B_0$$

$$0 < C < C_0$$



---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Allan, B.W., Beechem, J.M., Lindstrom, W.M., Reich, N.O. (1998). Direct real time observation of base flipping by the EcoRI DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273**, 2368-2373.
- Baker, D.J., Kan, J.L.C., Smith, S.S. (1988). Recognition of structural perturbations in DNA by human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *Gene* **74**, 207-210.
- Baldwin, G.S., Vipond, I.B., Halford, S.E. (1995). Rapid reaction analysis of the catalytic cycle of the EcoRV restriction endonuclease. *Biochemistry* **34**, 705-714.
- Barras, F., Marinus, M.G. (1989). The great GATC : DNA methylation in *E. coli*. *Trends Genet.* **5**, 139-143.
- Berg, O.G., von Hippel, P.H. (1985). Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 131-160.
- Bergerat, A., Kriebardis, A., Guschlbauer, W. (1989). Preferential site-specific hemimethylation of GATC sites in pBR322 DNA by Dam methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 4064-4070.
- Bergerat, A., Guschlbauer, W. (1990). The double role of methyl donor and allosteric effector of S-adenosyl-methionine for Dam methylase of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4369-4375.
- Bergerat, A., Guschlbauer, W., Fazakerley, G.V. (1991). Allosteric and catalytic binding of S-adenosylmethionine to *Escherichia coli* DNA adenine methyltransferase monitored by <sup>3</sup>H NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6394-6397.
- Bickle, T.A. (1987). In DNA Restriction and Modification Systems. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, Hrsg. Neidhardt, T.C. American Society for Microbiology, Washington, 692-696.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Biochemistry* **72**, 284-253.
- Byron, O.(1996). Size Determination of Proteins – A. Hydrodynamic Methods in : Proteins Labfax, N.C. Price Ed., BIOS, Cambridge.
- Cantor, C.R., Warshaw, M.M., Shapiro H. (1970). Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**, 1059-1077.
- Cal, S., Connolly, B.A., (1997). DNA distortion and base flipping by the *EcoRV* DNA methyltransferase. A study using interference at dA and T bases and modified deoxynucleosides. *J. Biol. Chem.* **272**, 490-496.
- CCP4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Cheng, X. (1995). Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 293-318.
- Connolly, B.A. (1991) in Eckstein, F. (ed.) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach. *IRL Press*, Oxford, 155-183.
- Creighton, T.E. (1993). Proteins: structure and molecular properties. W.H. Freeman and Company, New York, 344-346.
- Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 93-124.
- Eritja, R., Kaplan, B.E., Mhaskar, D., Sowers, L.C., Petruska, J., Goodman, M.F. (1986). Synthesis and properties of defined DNA oligomers containing base mispairs involving 2-aminopurine. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5869-5884.

- Fagan, P.A., Fabrega, C., Eritja, R., Goodman, M.F., Wemmer, D.E. (1996). NMR study of the conformation of the 2-aminopurine: cytosine mismatch in DNA. *Biochemistry* **35**, 4026-4033.
- Fujioka, M. (1992). Mammalian small molecule methyltransferases: Their structural and functional features. *Int. J. Biochem.* **24**, 1917-1924.
- Garcia-del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., Casadesus, J. (1999). DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion and M cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11578-11583.
- Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R.S., Scheidig, A.J., Weinhold, E. (2001). Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M·*TaqI* in complex with DNA and a cofactor analog. *Nature Struc. Biol.* **8**, 121-125.
- Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R.M., Cheng, X. (1997). Structure of *PvuII* DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2702-2715.
- Gonzalzo, M.L., Jones, P.A. (1997). Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutation Res.* **368**, 107-118.
- Guest, C.R., Hochstrasser, R.A., Sowers, L.C., Millar, D.P. (1991). Dynamics of mismatched base-pairs in DNA. *Biochemistry* **30**, 3271-3279.
- Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., Mahan, M.J. (1999). An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**, 967-970.
- Harrison, C.A., Turner, D.H., Hinkle, D.C. (1982). Laser crosslinking of *E. coli* RNA polymerase and T7 DNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2399-2415.
- Herman, G.E., Modrich, P. (1982). *Escherichia coli* dam methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**, 2605-2612.

- Ho, D.K., Wu, J.C., Santi, D.V., Floss, H.G. (1991). Stereochemical studies of the C-methylation of deoxycytidine catalyzed by *HhaI* methylase and the N-methylation of deoxyadenosine catalyzed by *EcoRI* methylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 264-269.
- Holz, B., Klimasauskas, S., Serva, S., Weinhold, E. (1998 a). 2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1076-1083.
- Holz, B. (1998 b). Verwendung von modifizierten Oligodesoxynukleotiden zur kinetischen und strukturellen Charakterisierung von DNA-modifizierenden Enzymen. Dissertation, Universität Dortmund.
- Holz, B., Dank, N., Eickhoff, J.E., Lipps, G., Krauss, G., Weinhold, E. (1999 a). Identification of the Binding Site for the Extrahelical Target Base in N<sup>6</sup>-Adenine DNA Methyltransferase by Photo-cross-linking with Duplex Oligodeoxynucleotides Containing 5-Iodouracil at the Target Position. *J. Biol. Chem.* **274**, 15066-15072.
- Holz, B., Weinhold, E. (1999 b). Higher binding affinity of duplex oligodeoxynucleotides containing 1,2-dideoxy-D-ribose to the N<sup>6</sup>-adenine DNA methyltransferase *M-TaqI* supports a base flipping mechanism. *Nucleosides & Nucleotides* **18**, 1355-1358.
- Jancarik, J., Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallisation of proteins. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800.
- Kao, J.Y., Goljer, I., Phan, T.A., Bolton, P.H. (1993). Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR. *J. Biol. Chem.* **268**, 17787-17793.
- Klimasauskas, S., Timinskas, A., Menkevicius, S., Butkiene, D., Butkus, V., Janulaitis, A. (1989). Sequence motifs characteristic of DNA[cytosine-N<sup>4</sup>]methyltransferases: similarity to adenine and cytosine-C<sup>5</sup> DNA-methylases. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9823-9832.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., Cheng, X. (1994). *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**, 357-369.

- Kubareva, E.A., Thole, H., Karyagina, A.S., Oretskaya, T.S., Pingoud, A., Pingoud, V. (2000). Identification of a base-specific contact between the restriction endonuclease *SsoII* and its recognition sequence by photocross-linking. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1085-1091.
- Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D.P., Jack, W.E., Schildkraut, I., Saenger, W. (1994). Three-dimensional structure of the adenine-specific DNA methyltransferase *M·TaqI* in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10957-10961.
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., Pelletier, S.M. (1992). Computer-Aided Interpretation of Analytical Sedimentation Data for Proteins. In: Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (S.E. Harding, A.J. Rowe, J.C. Horton, Hrsg.) *Royal Society of Chemistry*, Cambridge.
- Lauster, R., Trautner, T.A., Noyer-Weidner, M. (1989). Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognition domains. *J. Mol. Biol.* **206**, 305-312.
- Law, S.M., Eritja, R., Goodman, M.F., Breslauer, K.J. (1996). Spectroscopic and calorimetric characterizations of DNA duplexes containing 2-aminopurine. *Biochemistry* **35**, 12329-12337.
- LeMaster, D.M., Richards, F.M. (1985). <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N heteronuclear NMR studies of *Escherichia coli* thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type. *Biochemistry* **24**, 7263-7268.
- Lin, Z., Hung, K.N., Grollman, A.P., de los Santos, C. (1998). Solution structure of duplex DNA containing an extrahelical abasic site analog determined by NMR spectroscopy and molecular dynamics. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2385-2391.

- 
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.) (1998). In *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mac Donald, P.M., Mosig, G. (1984). Regulation of a new bacteriophage T4 gene, 69, that spans an origin of DNA replication. *EMBO J.* **3**, 2863-2871.
- Malone, T., Blumenthal, R.M., Cheng, X. (1995). Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.* **253**, 618-632.
- Malygin, E.G., Evdokimov, A.A., Zinoviev, V.V., Ovechkina, L.G., Lindstrom, W.M., Reich, N.O., Schlagman, S.L., Hattman, S. (2001). A dual role for substrate *S*-adenosyl-L-methionine in the methylation reaction with bacteriophage T4 Dam DNA-[N6-adenine]-methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2361-2369.
- Mannarelli, B.M., Balganesh, T.S., Greenberg, B., Springhorn, S.S., Lacks, S.A. (1985). Nucleotide sequence of the Dpn II DNA methylase gene of *Streptococcus pneumoniae* and its relationship to the dam gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4468-4472.
- Marzabal, S., DuBois, S., Thielking, V., Cano, A., Eritja, R., Guschlbauer, W. (1995). Dam methylase from *Escherichia coli*: kinetic studies using modified DNA oligomers: hemimethylated substrates. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3648-3655.
- Meisenheimer, K.M., Meisenheimer, P.L., Willis, M.C., Koch, T.H. (1996). High yield photocross-linking of a 5-iodocytidine (IC) substituted RNA to its associated protein. *Nucleic Acids Res.* **24**, 981-982.
- Messer, W., Noyer-Weidner, M. (1988). Timing and targetting the biological functions of Dam methylation in *E. coli*. *Cell* **54**, 735-737.
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 229-253.

- 
- Navaza, J. (1994). AmoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- Norris, C., Meisenheimer, P.L., Koch, T.H. (1996). Mechanistic studies of the 5-iodouracil chromophore relevant to its use in nucleoprotein photocross-linking. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5796-5803.
- Ogden, G.B., Pratt, M.J., Schaechter, M. (1988). The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell* **54**, 127-135.
- Pingoud, A., Urbanke, C. (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter de Gruyter Lehrbuch.
- Pingoud, A., Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3705-3727.
- Pingoud, V., Thole, H., Christ, F., Grindl, W., Wende, W., Pingoud, A. (1999). Photocross-linking of the homing endonuclease PI-*SceI* to its recognition sequence. *J. Biol. Chem.* **274**, 10235-10243.
- Pogolotti, A.L., Ono, A., Subramaniam, R., Santi, D.V. (1988). On the mechanism of DNA-adenine methylase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7461-7464.
- Rahn, R.O. (1992). Photochemistry of halogen pyrimidines: iodine release studies. *Photochem. Photobiol.* **56**, 9-15.
- Radman, M., Wagner, R. (1986). Effects of DNA methylation on mismatch repair, mutagenesis and recombination in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 523-538.
- Reich, O.R., Mashhoon, N. (1991). Kinetic Mechanism of the EcoRI DNA Methyltransferase. *Biochemistry* **30**, 2933-2939.

- 
- Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L., Lipscomb, W.N. (1995). The crystal structure of *Hae*III methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base-pairing. *Cell* **82**, 143-153.
- Roberts, R.J. (1995). On base flipping. *Cell* **82**, 9-12.
- Saenger, W. (1984). Principles of nucleic acid structure. *Springer*, Heidelberg.
- Scavetta, R.D., Thomas, C.B., Walsh, M.A., Szegedi, S., Joachimiak, A., Gumpert, R.I., Churchill, M.E.A. (2000). Structure of *Rsr*I methyltransferase, a member of the *N*6-adenine  $\beta$  class of DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3950-3961.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**(2), 368-379.
- Smith, M.A., Read, C.M., Kneale, G.G. (2001). Domain Structure and Subunit Interactions in the Type I DNA Methyltransferase M·*Eco*R124I. *J. Mol. Biol.* **314**, 41-50.
- Smith, K.C. (1964). The photochemical inactivation of deoxyribonucleic acid and protein *in vivo* and its biological importance. *Photochem. Photobiol.* **3**, 415-427.
- Smith, S.S., Hardy, T.A., Baker, D.J. (1987). Human DNA (cytosine-5) methyltransferase selectively methylates duplex DNA containing mispairs. *Nucl. Acids Res.* **15**, 6899-6916.
- Sowers, L.C., Fazakerley, G.V., Eritja, R., Kaplan, B.E., Goodman, M.F. (1986). Base pairing and mutagenesis: observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in a oligonucleotide by proton NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5434-5438.
- Stump, W.T., Hall, K.B. (1995). Cross-linking of an iodo-uridine-RNA hairpin to a single site on the human U1A N-terminal RNA binding domain. *RNA* **1**, 55-63.



- Taylor, I., Patel, J., Firman, K., Kneale, G. (1992). Purification and biochemical characterisation of the *EcoR*124 type I modification methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **20**, 179-186.
- Timinskas, A., Butkas, V., Janulaitis, A. (1995). Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6] methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases. *Gene* **157**, 3-11.
- Tran, P.H., Korszun, Z.R., Cerritelli, S., Springhoren, S.S., Lacks, S.A. (1998). Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the *DpnII* restriction system of *Streptococcus pneumoniae* bound to S-adenosylmethionine. *Structure* **6**, 1563-1575.
- Vilkaitis, G., Dong, A., Weinhold, E., Cheng, X., Klimasauskas, S. (2000). Functional Roles of the Conserved Threonine 250 in the Target Recognition Domain of *HhaI* DNA Methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **275**, 38722-38730.
- Voet, D., Voet, J.G. (1992). Biochemistry. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). A structure of desoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
- Ward, D.C., Reich, E., Stryer, L. (1969). Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides. *J. Biol. Chem.* **244**, 1228-1237.
- Wenzel, C., Moulard, M., Lobner-Olesen, A., Guschlbauer, W. (1991). Crosslinking of Dam methyltransferase with S-adenosyl-methionine. *FEBS Lett.* **280**, 147-151.
- Wilczek, L. (1999). Duplex-Oligodesoxynukleotide mit 5-Ioduracil und 2-Aminopurin zur Untersuchung der DNA-Bindung der Dam DNA-MTase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Dortmund.
- Willis, M.C., Hicke, B.J., Uhlenbeck, O.C., Cech, T.R., Koch, T.H. (1993). Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins. *Science* **262**, 1255-1257.

- 
- Wilson, G.G., Murray, N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 585-627.
- Wong, D.L., Reich, N.O. (2000) Identification of Tyrosine 204 as the Photo-Cross-Linking Site in the DNA-*EcoRI* DNA Methyltransferase Complex by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Biochemistry* **39**, 15410-15417.
- Wu, J.C., Santi, D.V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of *HhaI* methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4778-4786.
- Zinovev, V.V., Ovechkina, L.G., Malygin, E.G. (1996). Stoichiometry of Phage T4 *Dam* DNA (Adenine-N6)-Methyltransferase Binding with Oligonucleotide Substrates. *Mol. Biol.* **30**, 724-726.

## Danksagung

Als erstes möchte ich Gott danken, dass er mich so gemacht hat wie ich bin, mit all meinen Stärken und all meinen Schwächen, und dass er mich meinen Glauben nie hat vergessen lassen.

Weiterhin möchte ich den folgenden Personen danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

- Herrn Prof. Dr. Elmar Weinhold danke ich für die interessante Aufgabenstellung und Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. Roger Goody möchte ich für die Aufnahme in seine Abteilung, für die Hilfestellungen bei der Auswertung der kinetischen Daten, für die finanzielle Unterstützung und die Übernahme des Gutachtens danken.
- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kreiser danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und das stete Interesse am Fortschritt der Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Kristallisation, für das Ernten meiner Kristalle und die Aufnahme der Daten. Danken möchte ich ihm auch für die aufmunternden Worte, wenn es mal wieder nicht mit der Phasierung geklappt hat.
- Herrn Prof. Dr. Claus Urbanke danke ich für die Durchführung und Auswertung der UZ-Experimente.
- Nathalie Bleimling möchte ich danken, denn ohne sie hätte es keine Dam DNA-MTase gegeben. Sie war stets bemüht, mir hilfreiche Tips im Labor zu geben. Vielen dank auch für Deine Freundschaft.
- Meinen früheren Arbeitsgruppenmitgliedern Dr. Almut Friederich und Dr. Goran Pljevalj i danke ich für das gute Arbeitsklima und die stete Diskussionsbereitschaft. Die Tagung auf Kreta und die Tage im Anschluß werden mir in guter Erinnerung bleiben.
- Den guten Laborfeen Diana Jahnert und Anke Reulen danke ich für die vielen „selbstverständlichen“ Arbeiten, das herzliche Laborklima und die zahlreichen Gespräche, die nicht immer fachlich waren.
- Meinen Bürokollegen Janina Cramer, Silke Huber, Tresfore Dambe, Dr. Goran Pljevalj i und Dr. Paul Rothwell danke ich für das oftmals erheiternde Büroklima. Mit Euch war es immer lustig.
- Der gesamten Abteilung möchte ich für die immer gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft danken.
- Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern Regina Wilczek-Mainka und Paul Mainka. Ohne Eure finanzielle und elterliche Unterstützung und Fürsorge wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Vielen dank für alles.
- Meinen Schwiegereltern Gerda und Dieter Wielitzek danke ich für das Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.
- Last but not least möchte ich ganz besonders Holger danken. Er war immer verständnisvoll, wenn die Arbeit wichtiger zu sein schien und war immer da, wenn ich ihn gebraucht habe. Er hat mir aber auch gezeigt, daß es noch andere Dinge im Leben gibt. Dafür liebe ich Dich.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Lilianna Wielitzek  
Geburtsname: Wilczek  
Geburtsdatum: 20.05.1973  
Geburtsort: Gleiwitz (Oberschlesien)  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet seit 08.08.2000 mit Holger Wielitzek

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

1979 – 1983 Nicolaischule Städt. Gemeinschaftsgrundschule, Unna  
1983 - 1992 Pestalozzi-Gymnasium, Unna  
Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife

## AUSBILDUNG AN HOCHSCHULEN

---

04/1993 - 09/1993 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum  
10/1993 Wechsel zur Universität Dortmund  
10/1993 - 08/1999 Studium der Chemie an der Universität Dortmund  
10/1996 Vordiplom  
10/1998 Diplomprüfung  
11/1998 – 07/1999 Diplomarbeit am Fachbereich der Universität Dortmund unter Leitung von Prof. Dr. W. Kreiser und Prof. Dr. B. Lippert  
Thema: Duplex-Oligodesoxynukleotide mit 5-Ioduracil und 2-Aminopurin zur Untersuchung der DNA-Bindung der Dam-DNA-Methyltransferase aus *Escherichia coli*.  
Seit 08/1999 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung von Prof. Dr. R.S. Goody  
Thema: Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Aktivität der Dam DNA-Methyltransferase aus *Escherichia coli* mit Hilfe von biochemischen und biophysikalischen Methoden.