

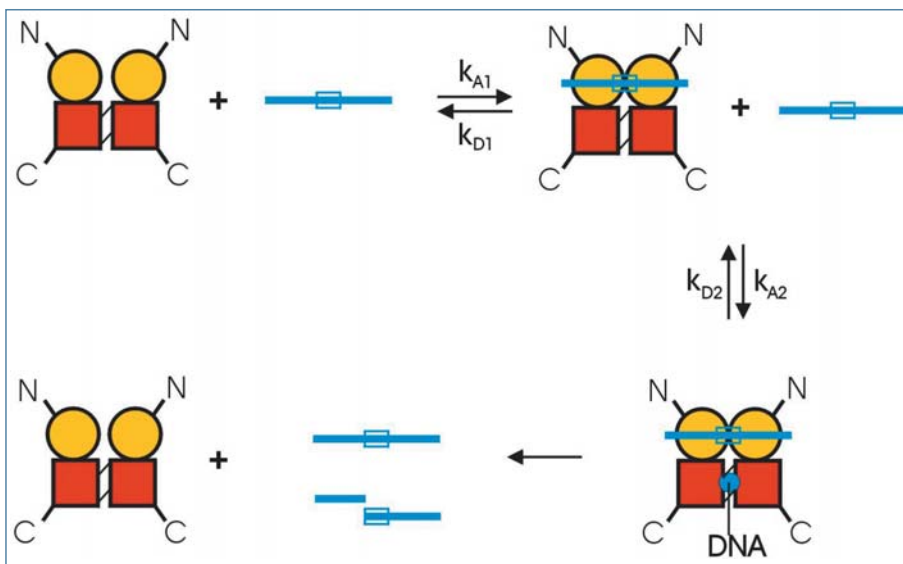
VAAM-Promotionspreisträger 2003

Besonderheiten der DNA-Erkennung und Spaltung durch die Restriktionsendonuklease EcoRII

Merlind Mücke

► Die homodimere TypIIE-Restriktionsendonuklease EcoRII erfordert im Gegensatz zu den orthodoxen TypII-Restriktionsendonukleasen die simultane Wechselwirkung mit zwei Kopien ihrer DNA-Erkennungssequenz 5'CCWGG, um die spezifische endonukleolytische Spaltung der DNA zu katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie bewiesen, dass EcoRII die Bildung von DNA-Schleifen an einem linearen DNA-Substrat mit zwei DNA-Erkennungsstellen induziert – ähnlich wie andere DNA-prozessierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Kinetische Untersuchungen der DNA-Spaltreaktion von EcoRII mit superhelikaler Plasmid-DNA, die entweder einen oder zwei DNA-Erkennungsstelle

für EcoRII enthielt, zeigten, dass EcoRII pro Spaltereignis nur an einem der beiden involvierten doppelsträngigen DNA-Erkennungsorte spaltet. Die Studie, in der EcoRII photochemisch mit den Basen der DNA-Erkennungssequenz vernetzt wurde, ergab ein asymmetrisches Vernetzungsmuster, das durch die partielle Asymmetrie an der A/T-Position der ansonsten palindromischen Erkennungssequenz hervorgerufen wird. Wir konnten zeigen, dass die Aminosäure Tyr41 von EcoRII das 5' C des 5'CCAGG-Stranges der Erkennungssequenz kontaktiert. Durch Aufklärung der Domänenorganisation von EcoRII konnten wir das Modell der EcoRII-DNA-Interaktion verbessern. Wir zeigten, dass für die simultane Interaktion des Enzyms EcoRII mit zwei Kopien der Erkennungssequenz zwei verschiedene Domänen verantwortlich sind. Die C-terminale Domäne ist eine neue Restriktionsendonuklease, die effizienter als das vollständige EcoRII an einzelnen Erkennungsorten spaltet. Die N-terminale Domäne bindet spezifisch an die DNA und reduziert die Aktivität des vollständigen Enzyms, indem sie die Spaltung von einem zweiten Erkennungsort abhängig macht. Daher nehmen wir an, dass EcoRII in der Evolution eine zusätzliche DNA-Bindungsfunktion in Form der N-terminalen Domäne akquiriert hat, um eine neue Proteinfunktion zu entwickeln, die die Spaltung von DNA und die Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsorten einschließt. Solche Interaktionen sind beispielsweise Voraussetzung für die DNA-Rekombination oder Transposition. Daher könnte die gegenwärtige EcoRII-Restriktionsendonuklease eine evolutionärer Übergang von ortsspezifischen Endonukleasen zu einem neuen Protein sein, das spezifisch mit zwei DNA-Orten interagiert.



Modell der EcoRII-DNA-Interaktion: Ein EcoRII-Homodimer erkennt zwei Kopien seiner DNA-Erkennungssequenz 5'CCA/TGG (Blau: DNA-Doppelstrang, Box: DNA-Erkennungssequenz für EcoRII). Ermöglicht wird das simultane Erkennen zweier identischer Erkennungssequenzen durch die Zwei-Domänenstruktur von EcoRII. Die N-terminalen Domänen eines jeden Monomers (gelbe Kreise) bilden zusammen eine DNA-Bindungslücke, an welche das erste DNA-Substrat bindet. Dieses initiale DNA-Bindungsereignis aktiviert die DNA-Bindungslücke, die von den beiden C-terminalen Domänen (rote Quadrate) gebildet wird, für die Bindung des zweiten DNA-Substrats. Nur das von den C-terminalen Domänen gebundene DNA-Substrat wird von der EcoRII-Restriktionsendonuklease gespalten. Die Abbildung zeigt die Interaktion von EcoRII mit zwei DNA-Erkennungssequenzen auf zwei verschiedenen DNA-Molekülen (trans-Interaktion). Im Fall der Interaktion mit zwei DNA-Erkennungssequenzen in einem DNA-Molekül entstehen DNA-Loops (cis-Interaktion).



Merlind Mücke

(Jahrgang 1972) studierte Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin. Diplom 1998 bei Prof. Detlev H. Krüger, Institut für Virologie, Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität bei Prof. Detlev H. Krüger und PD Dr. Monika Reuter.

boldt-Universität und Prof. Ulrich Koert am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, Thema: Herstellung von DNA-Konstrukten zum Studium von DNA-Protein-Wechselwirkungen des Restriktions-/Modifikationsenzym EcoP15. Promotion 2002 am Institut für Virologie, Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität bei Prof. Detlev H. Krüger und PD Dr. Monika Reuter.

nungssequenz zwei verschiedene Domänen verantwortlich sind. Die C-terminale Domäne ist eine neue Restriktionsendonuklease, die effizienter als das vollständige EcoRII an einzelnen Erkennungsorten spaltet. Die N-terminale Domäne bindet spezifisch an die DNA und reduziert die Aktivität des vollständigen Enzyms, indem sie die Spaltung von einem zweiten Erkennungsort abhängig macht. Daher nehmen wir an, dass EcoRII in der Evolution eine zusätzliche DNA-Bindungsfunktion in Form der N-terminalen Domäne akquiriert hat, um eine neue Proteinfunktion zu entwickeln, die die Spaltung von DNA und die Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsorten einschließt. Solche Interaktionen sind beispielsweise Voraussetzung für die DNA-Rekombination oder Transposition. Daher könnte die gegenwärtige EcoRII-Restriktionsendonuklease eine evolutionärer Übergang von ortsspezifischen Endonukleasen zu einem neuen Protein sein, das spezifisch mit zwei DNA-Orten interagiert.

Korrespondenzadresse:

Dr. Merlind Mücke
c/o Dr. Monika Reuter
Universitätsklinikum Charité
Institut für Virologie
Schuhmannstr. 20/21
D-10117 Berlin
Tel.: 030-450-525092
www.charite.de/virologie