

# ANGEWANDTE CHEMIE

90. Jahrgang 1978

Heft 2

Seite 79–150

## Restriktionsendonucleasen

Von Werner Arber<sup>[\*]</sup>

Restriktionsendonucleasen sind in Bakterien häufig anzutreffende Enzyme, welche DNA zu fragmentieren vermögen. Die Spaltung eines DNA-Moleküls findet nach Erkennen einer für jede Restriktionsendonuclease spezifischen Nucleotidsequenz statt. Ein Teil der Enzyme spaltet die DNA innerhalb dieser Erkennungssequenz. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Enzyme zur gezielten Fragmentierung von DNA-Molekülen bei strukturellen und funktionellen Analysen von genetischem Material anzuwenden. Die biologische Aufgabe der Restriktionsendonucleasen könnte darin bestehen, eine Art primitives Immunitätssystem zu bilden, das die Zelle befähigt, fremdes genetisches Material zu zerstören. Zum Schutz der eigenen DNA vor dem Abbau durch zelleigene Restriktionsendonucleasen dient die Methylierung von Nucleotiden, die in der Erkennungssequenz liegen. – Die Restriktionsendonucleasen wurden beim Studium der bei Wirtswechsel beobachteten Restriktion des Viruswachstums entdeckt.

### 1. Einleitung

Endonucleasen sind Enzyme mit der Fähigkeit, Nucleinsäure-Kettenmoleküle in Fragmente zu spalten. Je nach dem betrachteten Enzym wird die Nucleinsäure mehr oder weniger zufällig irgendwo gespalten, oder aber nur an spezifischen Stellen, die zum Beispiel durch die Sequenz der Nucleotide in der Nucleinsäure bestimmt werden. Im Prinzip führt die längere Einwirkung eines Enzyms des erstgenannten Typs zu einer weitgehenden Verdauung der Nucleinsäure zu relativ kleinen Oligonucleotiden. Im Gegensatz dazu produzieren die auf Desoxyribonucleinsäure (DNA) wirkenden, ortsspezifischen Endonucleasen reproduzierbare Populationen von Fragmenten spezifischer Längen; die Enden jedes Fragments werden durch den spezifischen Spaltungsort des Enzyms bestimmt.

Diese grobe Einteilung wird vielen in den letzten Jahren untersuchten Endonucleasen nicht gerecht. Es hat sich nämlich gezeigt, daß manches Enzym im nativen Zustand noch keine endonucleolytischen Funktionen ausüben kann, sondern zuvor einer Aktivierung bedarf. Dabei spielt die Wechselwirkung mit einer spezifischen Erkennungssequenz auf der Nucleinsäure eine wesentliche Rolle. Allgemein scheint die Erkennungsse-

quenz durch die Reihenfolge von vier bis vielleicht 20 Nucleotiden in der Nucleinsäure bestimmt zu sein. Dabei müssen die für die Erkennung wesentlichen Nucleotide nicht notwendigerweise aufeinanderfolgen, sondern können durch Nucleotide getrennt sein, die für die Erkennung unwesentlich sind.

Unter dem Begriff „Restriktionsendonucleasen“ wird eine große Anzahl von mikrobiellen Enzymen zusammengefaßt, welche DNA spezifisch spalten. Ein wesentliches gemeinsames Merkmal aller bisher studierter Restriktionsendonucleasen ist die Abhängigkeit der Spaltungsreaktion von einer Wechselwirkung mit einer spezifischen Erkennungssequenz. Je nach dem betrachteten Enzym geschieht die auf diese Aktivierung folgende Spaltung der Nucleinsäure am Erkennungsort selber, in einer gemessenen Distanz vom Erkennungsort, oder schließlich in relativ weiter Entfernung vom Erkennungsort an von Fall zu Fall verschiedenen Stellen. Bevor aber weiter auf die Charakterisierung dieser Reaktionen eingegangen werden soll, mögen folgende biologische Betrachtungen den Namen dieser Enzymfamilie erklären.

### 2. Entdeckung der Restriktions- und Modifikationssysteme

Beim Studium der Wirtsspezifität von bakteriellen Viren beobachteten Anfang der fünfziger Jahre mehrere Forscher,

[\*] Prof. Dr. W. Arber  
Biocentrum der Universität, Abteilung Mikrobiologie  
Klingelbergstraße 70, CH-4056 Basel (Schweiz)

daß diese Viren beim Wirtswechsel sich zunächst oft nur schlecht vermehrten, sich dann aber an den neuen Wirt adaptierten und in der Folge ungehindert wuchsen<sup>[1-4]</sup>. Diese Adaptation – wirtskontrollierte Modifikation genannt –, ist aber nicht genetisch stabil, d.h. es handelt sich nicht um die Selektion einer zum Wachstum fähigen Mutante. Vielmehr geht die für einen bestimmten Wirt spezifische Modifikation des Virus beim Wachstum in einem anderen Wirt wieder verloren, so daß bei erneuter Infektion des ersten Wirtes nur noch ein geringer Bruchteil der Viren sich weiter vermehren kann. Dieses Phänomen des durch den Wirt stark eingeschränkten Wachstums von Viren wurde Restriktion genannt. Abbildung 1 illustriert die wirtskontrollierte Restriktion und Modifikation bakterieller Viren an einem Beispiel.

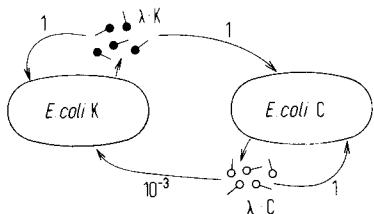


Abb. 1. Beispiel eines Restriktions- und Modifikationssystems. Die beiden *Escherichia coli*-Stämme K und C sind natürliche Wirte für den Bakteriophagen  $\lambda$ . Solange der Phage  $\lambda$  auf dem gleichen Wirt gezüchtet wird, gibt jedes Viruspartikel bei Infektion unter Optimalbedingungen Anlaß zur Produktion von Nachkommenviren (Plattierungswahrscheinlichkeit 1). Bei Wirtswechsel beobachtet man folgendes: Der Phage  $\lambda \cdot C$ , der auf Stamm C gewachsen ist, wächst auf Stamm K nur mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-3}$ . Die wenigen Nachkommen aber sind nun  $\lambda \cdot K$ , wachsen somit auf Stamm K gut. Andererseits wächst  $\lambda \cdot K$  auch auf Stamm C gut, wobei allerdings die neu produzierten Virusnachkommen, nun  $\lambda \cdot C$  geworden, den Stamm K nicht mehr infizieren können. In diesem Beispiel besitzt der Stamm K ein Restriktions- und Modifikationssystem, der Stamm C dagegen nicht. K akzeptiert alle Viren, unabhängig davon, auf welchem Wirt sie gewachsen sind. K akzeptiert nur jene Viren voll, die schon vorher auf K gewachsen und folglich K-spezifisch modifiziert waren. Von den auf C gewachsenen Viren modifiziert K lediglich 1%.

Die Frage nach den molekularen Vorgängen bei der Restriktion und der Modifikation konnte Anfang der sechziger Jahre zum entscheidenden Teil beantwortet werden: Sowohl die Restriktion als auch die Modifikation wirken sich direkt auf die DNA aus, also auf das genetische Material<sup>[5, 6]</sup>. Das war erstaunlich, wußte man doch, daß die Modifikation nicht genetisch stabil weitervererbt wird. Die folgenden Beobachtungen waren für die neuen Erkenntnisse entscheidend: In der Situation der Restriktion (z.B. Infektion des Stammes K mit dem Phagen  $\lambda \cdot C$ , Abb. 1) wurde die Phagen-DNA schnell von der überlebenden Wirtszelle abgebaut. Das bedeutet, daß bei der Restriktion das der Wirtszelle fremde genetische Material zerstört wird. Wurde andererseits der Phagen  $\lambda \cdot K$  für einen Wachstumszyklus auf dem nicht restriktiven Stamm C vermehrt, so zeigten allein jene Nachkommen noch K-spezifische Modifikation (waren also fähig, den Stamm K noch unbehindert zu infizieren), bei welchen wenigstens einer der beiden DNA-Stränge noch aus elterlichem Material bestand (semikonservative Replikation). Das zeigte, daß die Modifikation im Stamm K sich direkt auf die DNA auswirkt und deren weitere korrekte Replikation nicht hindert, ferner daß das modifizierende Prinzip bei der Replikation mit dem elterlichen DNA-Strang assoziiert bleibt.

In der Folge gelang dann der Nachweis, daß die Modifikation auf der Methylierung von Nucleotiden beruht<sup>[7-10]</sup>. Im hier besprochenen Beispiel des Stammes K werden gewisse

Adenine in spezifischen Nucleotidsequenzen zu  $N^6$ -Methyladeninen methyliert. Diese Methylierung verändert den genetischen Inhalt der Nucleinsäure in keiner Weise und scheint einzige den Zweck zu haben, die DNA gegen die Einwirkung der K-spezifischen Restriktionsendonuclease, wie das DNA-abbauende Enzym nun genannt wird, zu schützen. Im Gegensatz dazu kann dieses Enzym jede DNA spalten, der die spezifische Methylierung fehlt.

Aufgrund dieser Befunde ist es wahrscheinlich, daß Restriktions- und Modifikationssysteme den Zweck haben, die Trägerzelle gegen Infektion mit fremdem genetischem Material zu schützen, wobei die zelleigene DNA durch die modifizierende Methylierung vor der Wirkung der Restriktionsendonuclease bewahrt wird. Es wurde bald klar, daß das Phänomen nicht auf virale DNA beschränkt ist, sondern in gleicher Weise auch zelluläre DNA betrifft, so daß eine Restriktion z.B. auch beim genetischen Austausch zwischen zwei Bakterienstämmen wirksam ist, der durch Konjugation herbeigeführt wird<sup>[11-14]</sup>.

Andere biologische Funktionen als die hier zur Diskussion gestellten, welche einem primitiven Immunitätsystem mit direkter Wirkung auf nacktes genetisches Material gleichkommen, konnten bisher nicht erkannt werden, doch sind die Diskussionen darüber nicht abgeschlossen<sup>[15]</sup>.

Bisher ließen sich Restriktions- und Modifikationssysteme eindeutig nur in Bakterien nachweisen. Es scheint, daß sie in der Vielfalt der bakteriellen Spezies weit verbreitet sind. Systematische Studien blieben bisher auf relativ wenige Stämme beschränkt, vor allem *Escherichia coli* und damit verwandte Enterobakterien, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*- und *Haemophilus*-Arten<sup>[16, 17]</sup>. Die genetische Information für Restriktions- und Modifikationssysteme befindet sich oft auf dem bakteriellen Chromosom, hin und wieder aber auch auf Plasmiden oder auf Genomen von Bakteriophagen. In der Natur finden sich Bakterienstämme mit einem einzigen Restriktions- und Modifikationssystem, andere haben mehrere oft nicht miteinander verwandte Systeme, und schließlich gibt es auch Bakterienstämme, in denen bisher noch kein Restriktions- und Modifikationssystem nachgewiesen werden konnte. Ebenso kann man von Stämmen mit Restriktions- und Modifikationssystem Verlustmutanten isolieren, welche nun keine Restriktion und Modifikation mehr ergeben<sup>[18, 19]</sup>. Unter Laboratoriumsbedingungen scheinen solche mutierten Stämme keinen Nachteil gegenüber ihren unmutierten Vorfahren zu haben, doch mag das im ökologischen Gleichgewicht in der Natur anders sein.

Die Wirksamkeit eines Restriktions- und Modifikationssystems gegenüber einem fremden Genom hängt natürlich davon ab, ob dieses Genom für das betrachtete Restriktions- und Modifikationssystem sensitiv ist. Wie bereits angedeutet, ist dafür die Anwesenheit von spezifischen Erkennungsstellen für das Restriktions- und Modifikationssystem auf dem DNA-Molekül erforderlich. Bei sehr kleinen DNA-Molekülen, z.B. dem Genom eines kleinen Virus, kann es vorkommen, daß auf dem gesamten Genom keine Erkennungsstelle liegt. Wenn das Genom z.B. eine einzige Erkennungsstelle enthält, geht die Sensitivität gegen die Restriktion durch Mutation eines Nucleotids an dieser Spezifitätsstelle häufig verloren<sup>[20]</sup>. Auf diese Weise kann die Erkennungsstelle genetisch kartiert werden. Historisch führte diese Art von Experimenten zur Erkenntnis, daß Erkennungsstellen bei den Reaktionen Schlüssel-funktionen besitzen<sup>[21]</sup>.

### 3. Enzymologie von Restriktion und Modifikation

Als es nach langen Bemühungen gegen Ende der sechziger Jahre gelang, die Restriktionsendonucleasen aus *E. coli* K und aus damit verwandten Stämmen zu isolieren<sup>[22-24]</sup>, zeigte sich bald, daß diese recht großen Enzyme mit Molekulargewichten von etwa 450000 nicht nur unmodifizierte DNA in vitro spalten, sondern unter leicht veränderten Reaktionsbedingungen auch die für das betreffende Restriktions- und Modifikationssystem spezifische Methylierung katalysieren können<sup>[25]</sup>. Dabei erhält jeder Strang der DNA pro Erkennungsstelle eine Methylgruppe<sup>[10]</sup>. Es sei hier angemerkt, daß per definitionem das Methyl-akzeptierende Nucleotid Teil der Erkennungssequenz ist, da ja vollständig methylierte, d. h. modifizierte DNA weder vom Enzym angegriffen wird noch das Enzym in seiner Aktivität beeinträchtigt.

Allgemein hatte man erwartet, daß auch die Spaltungsreaktion an den Erkennungsstellen eintreten würde, doch wurden diese Erwartungen nicht erfüllt. Vielmehr zeigte es sich bei der in-vitro-Spaltung von kleinen DNA-Substraten mit nur wenigen Erkennungsstellen, daß die Spaltprodukte von sehr variabler Größe waren<sup>[26]</sup>. Demnach erfolgt die Restriktionsspaltung durch Restriktionsendonucleasen aus *E. coli* nicht am spezifischen Erkennungsplatz, sondern an anderer Stelle des DNA-Moleküls, und auch nicht immer am gleichen Ort. Nach Spaltung von DNA mit solchen Enzymen findet sich also ein bestimmter Abschnitt, z. B. ein spezifisches Gen, nicht in einer einheitlichen Population gleich langer Fragmente, sondern fast wie bei Zufallsfragmentierung in Fragmenten sehr verschiedener Länge.

Daß die Natur sich aber auch auf diesem Gebiet eine Mehrzahl von Spielformen erlaubt, wurde ab 1970 klar. Damals wurden aus einem *Haemophilus-influenzae*-Stamm ortsspezifische Endonucleasen isoliert, welche in der Tat ein gegebenes

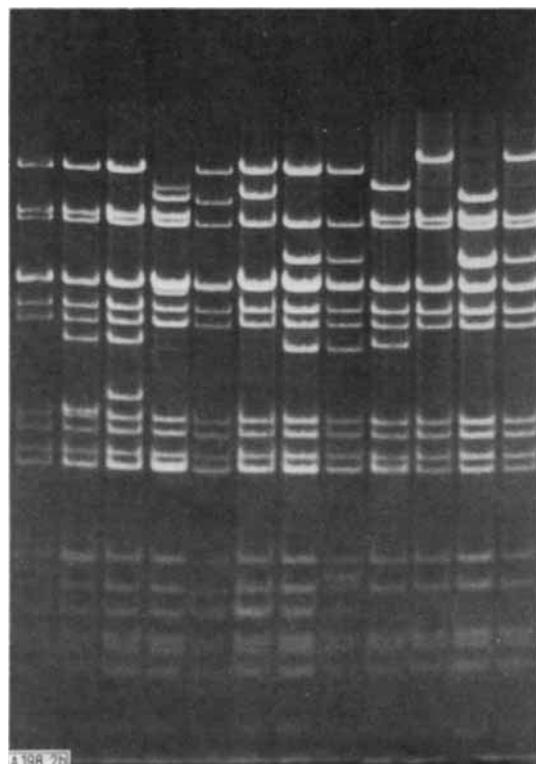
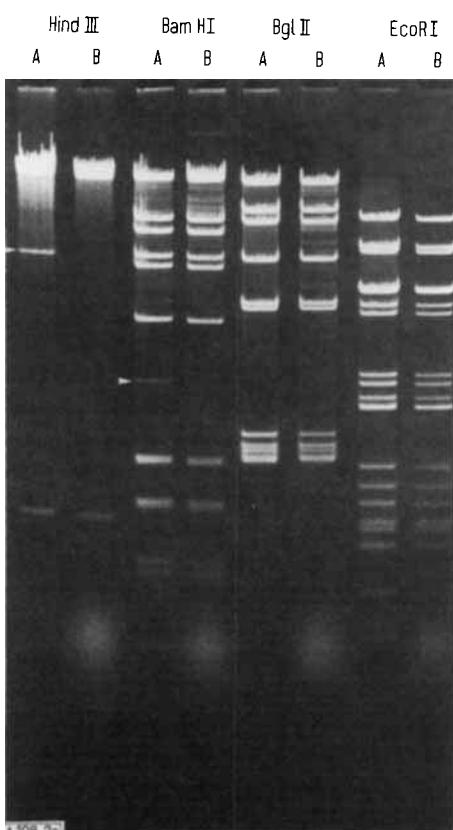


Abb. 2. Gel-Elektrophorese von Restriktionsspaltungsfragmenten des Genoms des Bakteriophagen P1. a) Restriktionsspaltung von P1-DNA (A: aus Phagenpartikeln isoliert; B: als Prophagengenom aus P1-lysogenen Bakterien isoliert) mit den Restriktionsendonucleasen HindIII, BamHI, BglII und EcoRI. Die elektrophoretische Wanderung der Fragmente erfolgte im Agarose-Gel von oben nach unten, umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Große Fragmente sind also oben, kleine unten. Die Fragmente wurden durch Beigabe von Ethidiumbromid und unter ultravioletter Bestrahlung sichtbar gemacht. Die mit einer Pfeilspitze markierten Banden finden sich nur in DNA, die aus Phagenpartikeln extrahiert wurde; dies deutet auf die Spezifität des Abpackens der DNA hin (HindIII und BamHI). Alle gut sichtbaren Banden stammen von vollkommener Verdauung, während sehr schwach sichtbare Banden von partieller Verdauung herführen (Aufnahme: Dr. Brigitte Bächli). b) Vergleich der EcoRI-Fragmentierung von P1-DNA (ganz links) mit denjenigen von elf unabhängig isolierten Deletions- und Insertionsderivaten des Bakteriophagen P1. Bei bekannter Restriktionsspaltungskarte kann aus fehlenden Banden auf den Ort der Deletion und Insertion geschlossen werden. Neue Banden stammen aus der Region, in der die Deletion stattgefunden hat, sowie von inseriertem Material und dessen unmittelbarer Nachbarschaft. Die sechs kleinsten EcoRI-Fragmente der P1-DNA sind bereits unten aus dem Gel gewandert (Aufnahme: Dr. Shigeru Iida).

DNA-Substrat in eine Population spezifischer Fragmente zu spalten vermochten<sup>[27]</sup>. Die Analyse der Nucleotidsequenz an den Enden der Spaltprodukte bestätigte die Spezifität der Spaltung<sup>[28]</sup>. Der heute einfachste Test zur Demonstration ortsspezifischer Spaltung eines DNA-Moleküls besteht in der elektrophoretischen Trennung der Fragmente in einem Agarose-Gel<sup>[29]</sup>. Die Fragmente wandern darin ungefähr umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts; die Banden der Fragmente können durch Zugabe von Ethidiumbromid in UV-Licht leicht sichtbar gemacht werden (Abb. 2).

Vor einigen Jahren setzte eine systematische Suche nach weiteren solchen Enzymen mit ortsspezifischer Spaltung von DNA-Molekülen ein. Absichtlich wurden Extrakte aus einer Vielzahl von Bakterienstämmen nur grob gereinigt und unter relativ einfach konzipierten Standardbedingungen auf die Fähigkeit untersucht, einige ausgewählte DNA-Moleküle spezifisch zu fragmentieren. Mit diesem Vorgehen fand man wie erwartet vornehmlich ortsspezifische Endonucleasen, deren Isolierung und deren Nachweis relativ unproblematisch ist.

Wahrscheinlich haben die Tests eine Reihe von ähnlichen Enzymen geringerer Stabilität und mit zusätzlichen Abhängigkeiten von Cofaktoren nicht nachzuweisen vermochten. Trotzdem war die Ausbeute dieser Untersuchungen erstaunlich reich, so daß heute bereits etwa 100 bakterielle, ortsspezifische Endonucleasen beschrieben sind<sup>[17]</sup>.

Nur für einige dieser Enzyme wurde bisher nachgewiesen, daß sie auch zu biologisch charakterisierten Restriktions- und Modifikationssystemen gehören. Trotzdem hat es sich bald eingebürgert, die ganze Gruppe der beschriebenen Enzyme „Restriktionsendonucleasen“ zu nennen.

Wie bereits diskutiert, gehören zu einem Restriktions- und Modifikationssystem immer zwei wesentliche Komponenten, nämlich die Spaltungsaktivität und die Modifikationsaktivität. Man kann wohl annehmen, daß die Modifikation häufig durch Methylierung zustandekommt, doch könnte man sich auch andere Schutzmaßnahmen der zelleigenen DNA gegen die Restriktionsendonuclease vorstellen.

#### 4. Spezifische Erkennung und Spaltung

Wie schon beschrieben, findet man in *E.-coli*-Bakterien relativ große Enzymkomplexe mit der Fähigkeit, DNA entweder zu spalten oder zu methylieren. Man kann sich fragen, wie diese Enzyme entscheiden, was sie tun sollen. Diese Entscheidung scheint stark von der Primärstruktur der DNA an den Erkennungsstellen abzuhängen. Wir wissen heute, daß die Restriktionsendonuclease aus *E. coli* K erst nach Aktivierung durch S-Adenosylmethionin befähigt ist, K-spezifische Erkennungsstellen auch effektiv zu erkennen (Abb. 3). In doppel-

Aus dieser Aufstellung geht hervor, daß es für die Zelle vorteilhaft ist, wenn der Enzymkomplex sich bei unmodifizierten (unmethylierten) Erkennungsstellen entscheidet, die DNA zu spalten, was zur Zerstörung eindringender Fremd-DNA führt, und wenn der Komplex sich bei modifizierter (an einem Strang methylierter) DNA entscheidet, auch den zweiten Strang zu methylieren. Vollständig methylierte Erkennungsstellen werden zwar ebenfalls vom Enzym erkannt, doch aktivieren sie es nicht, sondern setzen es frei. Diese für eine Zelle logische Reaktionsweise scheint in der Tat die Basis für das weitere Verhalten des Enzyms auf der DNA zu sein<sup>[32]</sup>. Man nimmt an, daß als physische Manifestation der Entscheidung im Erkennungsprozeß spezifische Konformationsänderungen des Enzymkomplexes eintreten, welche das Enzym in den Spaltungsmodus oder in den Methylierungsmodus leiten. Es sei hier nochmals daran erinnert, daß diese komplexen *E.-coli*-Enzyme die DNA weit außerhalb der Erkennungsstelle spalten, was z. B. durch Rückfaltung des DNA-Moleküls erreicht werden könnte. Auf jeden Fall wird zur Spaltung, wie auch bereits zur aktiven Erkennung, ATP benötigt.

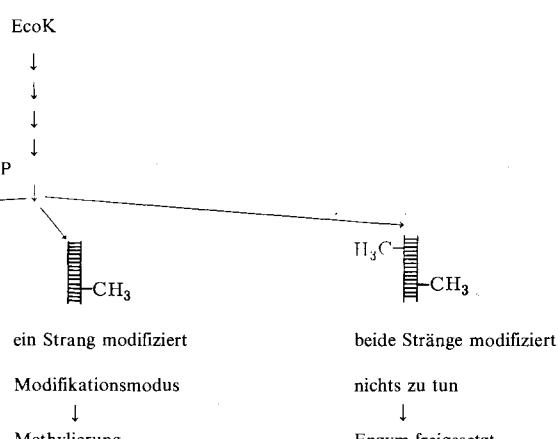
Primär verantwortlich für den eigentlichen Erkennungsprozeß dieser Enzyme scheint eines der drei Genprodukte zu sein, die den Enzymkomplex bilden<sup>[21]</sup>. Mutanten im verantwortlichen Gen haben die Fähigkeit zu spezifischer Erkennung verloren. Das Produkt dieses Gens koppelt die Spezifität der Erkennung für die Methylierungsreaktion mit jener für die Spaltungsreaktion. Diese Situation weist auf den biologischen Sinn der Koppelung der Modifikation mit der Restriktion hin: die zelleigene DNA soll optimal geschützt werden.

Bei der großen Gruppe der ortsspezifischen Restriktionsendonucleasen zeichnet sich wenigstens für einige Enzyme das

1. Bindung von S-Adenosylmethionin
  2. Aktivierung durch Bindung von S-Adenosylmethionin
  3. Abtasten der DNA nach K-spezifischen Erkennungsstellen
  4. Erkennen der K-spezifischen Nucleotidsequenz
  5. Entscheidung über weiteres Verhalten, je nach Struktur der Erkennungsstelle (ATP nötig):
- nicht modifiziert
- Spaltungsmodus
6. Spaltung, meist weit entfernt vom Erkennungsstift (Zurückfalten der DNA oder Wanderung?) (ATP nötig)
  7. Nach Spalten: ATPase-Aktivität
  8. Zerfall des Komplexes (Enzym nicht erneut verwendbar)

Abb. 3. Wirkungsweise der Restriktionsendonuclease EcoK (schematisch) [30, 31].

strängiger DNA kann eine solche Stelle in einem der drei folgenden Zustände sein: 1. Sie besitzt noch keine durch K-spezifische Modifikation eingeführte Methylgruppe. Diesen Zustand hat normalerweise infizierend wirkende Fremd-DNA. 2. Die DNA ist bereits in einem Strang methyliert, aber nicht im anderen. Dieser Zustand entsteht routinemäßig bei jeder DNA-Replikationsrunde von zuvor vollständig modifizierter DNA. 3. Beide Stränge tragen je eine Methylgruppe an der Erkennungsstelle. Dieser Zustand wird durch Einwirkung der Modifikationsaktivität auf den zweiten Zustand kurz nach der DNA-Replikation wieder hergestellt.



folgende Bild ab, das allerdings noch nicht verallgemeinert werden sollte. Die von einem *E.-coli*-Plasmid codierte Restriktionsendonuclease EcoRI ist ein Dimer oder Tetramer eines Polypeptids mit dem Molekulargewicht 28 500<sup>[33]</sup>. Sie ist also das Produkt nur eines Gens. Dieses Enzym kann DNA nur endonukleolytisch spalten, nicht aber auch gegen diese Spaltung schützen. Das gleiche *E.-coli*-Plasmid codiert aber noch für eine DNA-Methylase vom Molekulargewicht 40 000<sup>[34, 35]</sup>. Die durch dieses Enzym katalysierte Methylierung findet in der für die Endonuclease EcoRI spezifischen Erkennungssequenz statt (Tabelle 1). Die beiden Enzyme sind also die

beiden Teile des EcoRI-spezifischen Restriktions- und Modifikationssystems. Bemerkenswert ist in diesem Fall, daß es sich dabei um zwei vielleicht unabhängige Genprodukte handelt, die unter Umständen sogar in der Evolution unabhängig voneinander entstanden sein könnten. Diese Vermutung ist allerdings experimentell nicht belegt; man könnte sich auch eine Divergenz der beiden Gene nach einer ursprünglichen Genduplikation vorstellen unter Beibehaltung des zur spezifischen Erkennung einer Nucleotidsequenz nötigen Teils der Genprodukte.

In einigen Fällen wurde die endonukleolytische Spaltreaktion näher untersucht<sup>[22, 27, 33]</sup>. Dabei wurde gefunden, daß zunächst einer der Stränge doppelsträngiger DNA gespalten wird; unter günstigen Umständen ist es möglich, das Zwischenprodukt zu isolieren. Im zweiten Schritt wird auch der zweite DNA-Strang durchbrochen. Einige wenige Restriktionsendonukleasen scheinen auch fähig zu sein, Einzelstrang-DNA spezifisch zu spalten<sup>[36–38]</sup>.

Interessant ist die Analyse der Enden der DNA-Fragmente. Diese Enden sind für die Spaltprodukte vieler ortsspezifisch

Tabelle 1. Beispiele für Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen. Die meisten Daten stammen aus Roberts' Aufsatz [17], der auch die Originalzitate enthält, der Rest aus unpublizierten Arbeiten von R. J. Roberts und T. A. Bickle. Die Erkennungssequenzen sind so angeordnet, daß die 5'-terminalen Enden oben links und unten rechts liegen. Pfeile zeigen die Spaltstellen an. Soweit bekannt, sind die Nucleotide mit einem Stern markiert, die bei der Modifikationsreaktion methyliert werden. Nucleotidbasen: C = Cytosin, G = Guanin, A = Adenin, T = Thymin, Py = Cytosin oder Thymin, Pu = Guanin oder Adenin. Die Bezeichnungen der Restriktionsendonukleasen wurden wie folgt abgeleitet: Der Abkürzung für den Namen des Mikroorganismus, z. B. BamH für *Bacillus amyloliquefaciens* H, folgt die Nummer des aus dem betreffenden Stamm isolierten Enzyms (in römischen Ziffern).

Erkennungssequenz	Spezifisch für folgende Restriktionsendonukleasen
G↓ G A T C C C C T A G↑ 	BamHI
A↓ G A T C T T C T A G↑ A 	BglII
↓ G A T C C T A G↑ 	MboI
↓ A G C T T T T C G A A 	HindIII
C T G C A G G A C G T C 	PstI
G↓ A A T T C C T T A A G↑ 	EcoRI
G T Py↓ Pu A C C A Pu Py T G 	HindII
↓ C C A G G G G T C C↑ 	EcoRII
C↓ C C G G G G G G C C↑ C 	XbaI
C C C↓ G G G G G G C C C 	SmaI
C↓ C G G G G C C 	HpaII, HapII, MboI
T G G↓ C C A A C C G G T 	BalI
G G↓ C C C C G G 	BsuI, HaeIII

spaltender Restriktionsendonukleasen recht gut bekannt. Manche der Enzyme zerlegen die beiden Stränge auf gleicher Höhe, andere in einer Distanz, so daß im zweiten Fall doppelsträngige DNA-Fragmente mit kurzen Einzelstrangenden resultieren. Tabelle 1 enthält einige Beispiele für diese beiden Typen. Ebenfalls in Tabelle 1 aufgenommen ist, soweit bekannt, die Position der in der Modifikationsreaktion methylierbaren Nucleotide. Ein Vergleich der Beispiele zeigt die Vielfalt der Möglichkeiten.

Fast alle Erkennungssequenzen in Tabelle 1 zeigen zweifache Rotationssymmetrie. Dies mag mit der spezifischen Wechselwirkung der Enzyme mit Doppelstrang-DNA zusammenhängen. Aufgrund dieser Erkenntnis und der Tatsache, daß DNA aus nur vier Nucleotiden aufgebaut ist, läßt sich einerseits die durchschnittliche Häufigkeit einer spezifischen Erkennungssequenz in der DNA voraussagen, andererseits aber auch die maximal mögliche Anzahl von Erkennungssequenzen einer gegebenen Länge berechnen<sup>[21]</sup>. Von den 16 möglichen rotationssymmetrischen Tetranucleotidpaaren wurden bis jetzt sieben als Erkennungssequenzen einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen nachgewiesen<sup>[17]</sup>.

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, daß manchmal zwei unabhängige Restriktionsendonukleasen zwar die gleiche Nucleotidsequenz erkennen, sie aber dann verschiedenartig spalten. Andererseits existieren unabhängige Enzyme, die sogar die gleichen Spaltprodukte ergeben, aber markante Unterschiede in der Kinetik der Enzymreaktion zeigen<sup>[17]</sup>.

## 5. Restriktionsendonukleasen in der biologischen Forschung

Mit den ortsspezifisch spaltenden Restriktionsendonukleasen hat die Natur dem Forscher ein Reservoir lange ersehnter Werkzeuge geschenkt, welche es ermöglichen, das genetische Material systematisch zu untersuchen. Solange man bei der Fragmentierung von großen DNA-Molekülen auf das Eintreten von Zufallsbrüchen angewiesen war, durfte man nicht damit rechnen, ein einheitliches Material für strukturelle und funktionelle Analysen zu erhalten. Dieses Ziel ist mit Restriktionsendonukleasen inzwischen erreicht worden.

Eines der Ziele des Molekulargenetikers besteht darin, die genaue Nucleotidsequenz eines Genoms zu erkennen. Da die meisten Genträger sehr, sehr lange DNA-Kettenmoleküle sind, muß dabei systematisch vorgegangen werden. Der Analyse am einfachsten zugänglich sind kleine Genome, z. B. die DNA-Moleküle kleiner Viren. Der erste Schritt zu deren Analyse besteht im Erstellen einer Restriktionsspaltungskarte, d. h., man versucht, alle für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen spezifischen Spaltungsstellen auf dem Genom zu kartieren (vgl. Abb. 4). Das kann zum Beispiel durch schrittweises Vorgehen unter Isolierung partial gespaltener Zwischenprodukte erreicht werden oder auch durch Doppelverdauungsexperimente, wobei die Produkte der Spaltung durch die erste Restriktionsendonuklease isoliert und dann mit einer zweiten Restriktionsendonuklease behandelt werden. Diese und eine Reihe von ergänzenden Techniken mit spezifischer radioaktiver Markierung von Fragmentenden ermöglichen es, meist eindeutige physikalische Genomkarten herzustellen. Ein Beispiel ist in Abbildung 4 gezeigt.

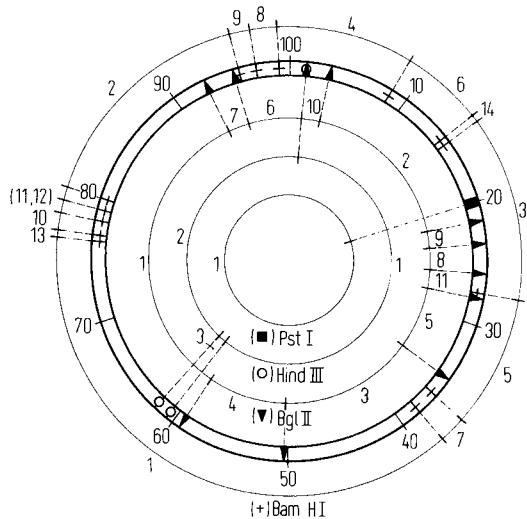


Abb. 4. Restriktionsspaltungskarte des Genoms des Bakteriophagen P1 [39]. Das Genom des Bakteriophagen P1 findet sich in P1-lysogenen Bakterien als autonomes Plasmid, somit als kreisförmiges DNA-Molekül, von etwa 90000 Basenpaaren (Molekulargewicht etwa  $59 \times 10^6$ ). Für die physikalische Genkarte ist das Genom in 100 Einheiten unterteilt, deren Skala auf dem kräftig gezeichneten Ring gegeben ist. Ebenfalls auf diesem Kreis eingezeichnet sind Spaltungsstellen für folgende vier Restriktionsendonukleasen: PstI (■), HindIII (○), BglII (▼) und BamHI (+). Diese Spaltungsstellen sind für jedes der Enzyme auf einen gesonderten, fein gezeichneten Kreis übertragen; die DNA-Fragmente sind dabei nach ihrer Größe numeriert (1 = längstes Fragment, etc.). (Die Anordnung der Nachbarfragmente 11 und 12 der Spaltung mit BamHI ist noch nicht bekannt.) Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, erkennt jede der vier verwendeten Restriktionsendonukleasen eine spezifische Sequenz von sechs Nucleotidpaaren. In statistisch aus den vier natürlichen Desoxyribonucleotiden aufgebauter DNA (P1-DNA enthält allerdings je etwa 23 % Guanin- und Cytosin- sowie je etwa 27 % Adenin- und Thymin-Nucleotide [40]) erwartet man statistisch ein spezifisches Hexanucleotid pro 4096 Nucleotide. Für ein DNA-Molekül der Größe des P1-Genoms würden sich dann für jede der hier betrachteten Restriktionsendonukleasen 22 Erkennungsstellen ergeben. Experimentell wurden elf Spaltstellen für BglII gefunden, 14 für BamHI, drei für HindIII und eine einzige für PstI. Andererseits besitzt das P1-Genom 26 Spaltstellen für das Enzym EcoRI, welches ebenfalls ein spezifisches Hexanucleotid erkennt (Tabelle 1). Diese Daten spiegeln die von rein statistischer Verteilung abweichende sequenzielle Anordnung der Nucleotidbausteine des genetischen Materials wider.

Durch elektronenmikroskopische Hybridisierungsstudien zwischen denaturierten Restriktionsfragmenten und zwischen diesen und dem Gesamtgenom können die effektiven physikalischen Distanzen nachgeprüft und Unsicherheiten geklärt werden.

Ein weiterer Schritt besteht dann darin, die genetische Information auf den Genomabschnitten zu identifizieren. Auch hier spielen gereinigte Restriktionsfragmente eine wesentliche Rolle, wobei mehrere Wege versucht werden können, um die genetische Information zum Ausdruck zu bringen.

Zur Bestimmung der Nucleotidsequenzen von DNA stehen heute eine Reihe von sehr guten Methoden zur Verfügung<sup>[41 - 43]</sup>. Ideales Ausgangsmaterial ist aber nach wie vor ein möglichst reines Präparat des zu analysierenden Materials. Dabei sind Fragmente mit etwa 100 Nucleotiden der Analyse direkt zugänglich. Aufgrund detaillierter Restriktionsspaltungskarten lassen sich Restriktionsendonukleasen auswählen, mit denen die Spaltung zu solchen Fragmenten eines Genombereiches möglich ist. Hier mag vielleicht noch beigefügt werden, daß das primäre Interesse der molekulargenetischen Forschung heute eher den auf einem Genom enthaltenen „Satzzeichen“ als der Gesamtsequenz eines Gens gilt, das ein spezifisches Polypeptid codiert. Unter Satzzeichen versteht man die

Stellen der Nucleinsäure, bei denen z. B. die Replikation der mRNA beginnt und endet, bei denen die Synthese eines Polypeptides anfängt und endet, ferner die für die Eigenreplikation der DNA wichtigen Stellen. Weiteres Interesse gilt den Stellen mit spezifischer Affinität für funktionell wichtige Genprodukte, z. B. Repressormoleküle. Schließlich wird auch dem Studium von jenen Stellen auf einem Genom große Bedeutung geschenkt, welche für stark erhöhte Rekombinationswahrscheinlichkeit verantwortlich sind. Aus der Struktur all dieser Stellen hofft man genauere Aussagen über die Mechanismen der Regulation der Genexpression und den Grad der Konstanz des

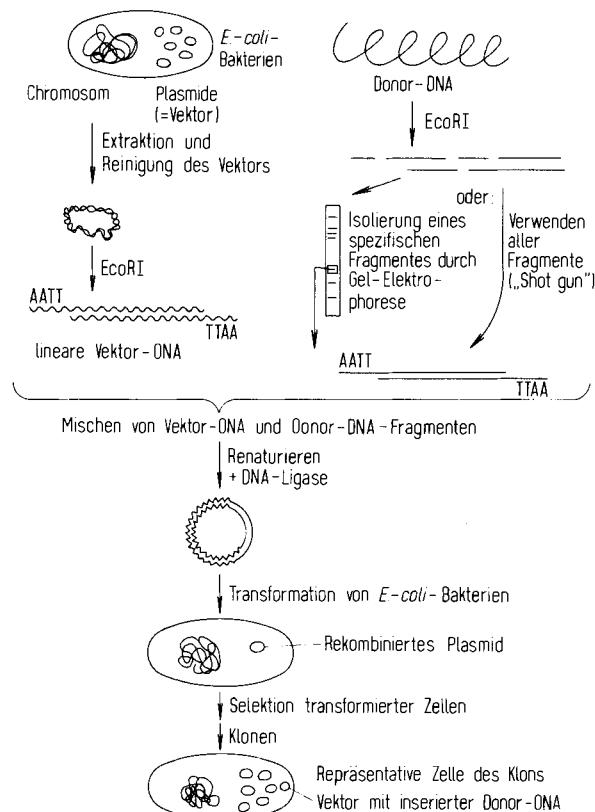


Abb. 5. Schema eines einfachen in-vitro-Neukombinationsexperiments. Im hier dargestellten Beispiel dient als Vektor ein kleines (Molekulargewicht etwa  $5 \times 10^6$ ), nur einige gut charakterisierte Gene tragendes, autonom replizierendes Plasmid mit nur einer Spaltstelle für die Restriktionsendonuclease EcoRI. Bei Spaltung mit EcoRI entsteht aus dem ringförmigen Plasmid ein lineares DNA-Molekül mit einsträngigen Enden, welche sich unter Renaturierungsbedingungen leicht wieder zusammenfinden können. Wird aber dabei ebenfalls mit EcoRI gespalte Donor-DNA zugefügt, so werden häufig auch ein oder mehrere Donor-DNA-Fragmente in den sich bildenden Ring aufgenommen. Die Cyclisierung zum kovalent gebundenen Ring gelingt mit dem Enzym DNA-Ligase. Im Transformationsschritt dringt die Plasmid-DNA mit einer zwar geringen, aber reproduzierbar Wahrscheinlichkeit in eine *E.-coli*-Zelle ein. Die mit rekombinierten Plasmiden transformierten Zellen können bei geschickter Wahl des Vektors aufgrund spezifischer Vektorfunktionen aus der großen Anzahl nicht transformierter *E.-coli*-Zellen selektiert werden. Die transformierten Bakterien werden durch „Klonen“ gereinigt, d. h. durch Aufwachsen einer Kultur aus einer Einzelzelle. Alle Zellen eines Klons sind daher genetisch und funktionell identisch. Im dargestellten Beispiel besitzt jede Bakterienzelle mehrere Plasmide. Durch spezielle experimentelle Anordnung kann deren Zahl sogar stark erhöht werden. Das rekombinierte Donor-DNA-Fragment läßt sich durch Isolieren der rekombinierten Plasmide aus den transformierten Klon und erneute Spaltung des Plasmids mit EcoRI in reiner Form und in der gewünschten Menge erhalten. Das klonierbare Fragment der Donor-DNA kann mehrfach größer als das Plasmid sein. Nach unten ist dieser Größe im Prinzip keine Grenze gesetzt. Vor der Rekombination kann man eine spezifische Größe des Donor-DNA-Fragments durch Gel-Elektrophorese auswählen, oder man kann alle Donor-DNA-Fragmente in die Renaturierungsmischung geben („Shot gun“-Experiment).

genetischen Materials ableiten zu können. Selbstverständlich kann sich diese Forschung nicht allein auf biochemisch-physikalischem Niveau abspielen, sondern muß durch systematische genetische Studien, die Charakterisierung von spezifischen Mutanten und das Studium von deren Auswirkungen ergänzt werden. Daher sind solche Forschungen ein sehr umfängliches Unternehmen und unmittelbar nur auf einige ausgewählte, intensiv studierte Systeme anwendbar.

Allerdings ist es auch wünschenswert, gewisse Abschnitte von komplexeren Genomen, z. B. die eukaryotischen Chromosomen, detailliert zu analysieren. Auch hier hat die Anwendung von Restriktionsendonucleasen wesentliche Hilfe gebracht. Einzelne Restriktionsspaltungsfragmente lassen sich mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase kovalent in kleine, zur Selbstreplikation befähigte DNA-Moleküle (Plasmide oder Genome von Bakteriophagen) einbauen, die man in diesem Fall Vektoren nennt<sup>[44, 45]</sup>. Dieser Einbau geht besonders leicht, wenn sowohl Vektor-DNA als auch das einzubauende DNA-Fragment kurze, komplementäre Einzelstrangenden tragen, wie sie viele der Restriktionsendonucleasen (Tabelle 1) ergeben. Solche Enden hybridisieren spontan, so daß die zusammengebrachten DNA-Fragmente leicht verknüpft werden können. Diese Technik ist als in-vitro-Neukombination von DNA bekannt geworden (Abb. 5). Sie ermöglicht es, genetisches Material beliebigen Ursprungs zu kombinieren. Ziel solcher Experimente ist es, das in den Vektor eingebaute Fragment soweit zu vermehren („Klonen“), bis man genügend Material für die strukturelle und funktionelle Analyse hat. An solche Analysen könnte natürlich ohne Aussortieren aus dem gesamten Genträger nie gedacht werden.

Ein weiterer Schritt in der Anwendung dieser Technik kann darin bestehen, daß man in Kenntnis der genetischen Information eines geklonten DNA-Fragments versuchen kann, die Expression dieser Information unter besonders günstigen Umständen zu erzielen, so daß große Mengen dieses spezifischen Genproduktes entstehen und mit relativ geringem Aufwand gereinigt werden können. Mögliche Anwendungen dieser Methodik sind beispielsweise die Produktion medizinisch wichtiger Antiseren oder anderer bioorganischer Genprodukte mit ökonomischer Bedeutung. In all diesen Fällen dürfte die Kenntnis der „Satzzeichen“ für die optimale Expression der interessierenden Gene eine bedeutende Rolle spielen. In dieser Hinsicht sind allerdings noch viele Probleme zu lösen.

Die Möglichkeit der in-vitro-Verflechtung genetischen Materials verschiedenen Ursprungs hat der Wissenschaft die Frage nach etwaigen, schwer voraussehbaren, unerwünschten Effekten neu kombinierten Genmaterials gestellt. Erstaunlich schnell sind Sicherheitsmaßnahmen vorgeschlagen worden, um mögliche Risiken einzudämmen<sup>[46]</sup>. Inwieweit die viel diskutierten Risiken reell sind, wird man erst in Kenntnis des natürlichen Genflusses innerhalb des gesamten genetischen Potentials beurteilen können. Die unbeantwortete Frage lautet, ob in der Evolution und im täglichen biologischen Geschehen stets ein gewisser Austausch genetischer Information zwischen unverwandten Lebewesen zulässig war und ist oder ob die Speziesbarrieren sehr strikt sind. Es gibt zwar Hinweise, daß ein sogenannter illegitimer Austausch in der Natur immer wieder vor sich geht, aber solide statistische Daten über dieses Geschehen fehlen noch weitgehend und sind auch nicht leicht einzuholen. Man kann sich fragen, ob die vielfach diskutierte Universalität des genetischen Codes auch zustandegekommen wäre, wenn es lebenden Organismen verboten bliebe, mit un-

verwandten Spezies hin und wieder Genomabschnitte auszutauschen. Man könnte sich vorstellen, daß unter strikter Abkapselung mehr als ein einziger genetischer Code entstanden wäre.

Im Hinblick auf die weltweite Diskussion über ein Verbot gewisser Forschungszweige, die durch die Möglichkeit der in-vitro-Neukombination von DNA entbrannt ist, mag der Hinweis angebracht sein, daß bei jeder Art von Grundlagenforschung die langfristige Auswirkung eines Resultates nicht vorausgesehen werden kann. Diese Einsicht macht jede Forschungslenkung und das Setzen von Barrieren problematisch. Um 1960 war die Erforschung der Vorgänge bei der wirtskontrollierten Restriktion und Modifikation von Viren ein rein mikrobiologisches Problem mit medizinischem Interesse. Man wollte wissen, wie die Zellen es bewerkstelligen, alle außer den zuvor in den eigenen Schwesterzellen gewachsenen Viren abzuwehren. Die Erkenntnis, daß diese Abwehr sich auf dem Niveau der viralen DNA abspielt und zu deren Abbau führt, eröffnete dann den Weg zur Isolierung der Restriktionsendonucleasen und deren weiterer Anwendung zum Studium von Struktur und Funktion der DNA.

Eingegangen am 1. Juni 1977 [A 198]

- [1] S. E. Luria, M. L. Human, *J. Bacteriol.* 64, 557 (1952).
- [2] G. Bertani, J. J. Weigle, *J. Bacteriol.* 65, 113 (1953).
- [3] E. S. Anderson, A. Felix, *Nature* 170, 492 (1952).
- [4] D. J. Ralston, A. P. Krueger, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80, 217 (1952).
- [5] W. Arber, D. Dussoix, *J. Mol. Biol.* 5, 18 (1962).
- [6] D. Dussoix, W. Arber, *J. Mol. Biol.* 5, 37 (1962).
- [7] W. Arber, *J. Mol. Biol.* 11, 247 (1965).
- [8] W. Arber, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 18, 295 (1968).
- [9] J. D. Smith, W. Arber, U. Kühlein, *J. Mol. Biol.* 63, 1 (1972).
- [10] U. Kühlein, W. Arber, *J. Mol. Biol.* 63, 9 (1972).
- [11] W. Arber, *Pathol. Microbiol.* 25, 668 (1962).
- [12] H. Boyer, *J. Bacteriol.* 88, 1652 (1964).
- [13] J. Pittard, *J. Bacteriol.* 87, 1256 (1964).
- [14] W. Arber, M. L. Morse, *Genetics* 51, 137 (1965).
- [15] W. Arber, *Trends Biochem. Sci.* 2, 176 (1977).
- [16] H. W. Boyer, *Annu. Rev. Microbiol.* 25, 153 (1971).
- [17] R. J. Roberts, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4, 123 (1976).
- [18] S. W. Glover, J. Schell, N. Symonds, K. A. Stacey, *Genet. Res.* 4, 480 (1963).
- [19] W. B. Wood, *J. Mol. Biol.* 16, 118 (1966).
- [20] W. Arber, U. Kühlein, *Pathol. Microbiol.* 30, 946 (1967).
- [21] W. Arber, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.* 38, 467 (1969).
- [22] M. Meselson, R. Yuan, *Nature* 217, 1110 (1968).
- [23] T. Takano, T. Watanaabe, T. Fukasawa, *Virology* 34, 290 (1968).
- [24] S. Linn, W. Arber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 1300 (1968).
- [25] A. Haberman, J. Heywood, M. Meselson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3138 (1972).
- [26] K. Horiuchi, N. D. Zinder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3220 (1972).
- [27] H. O. Smith, K. W. Wilcox, *J. Mol. Biol.* 51, 379 (1970).
- [28] T. J. Kelly Jr., H. O. Smith, *J. Mol. Biol.* 51, 393 (1970).
- [29] P. A. Sharp, B. Sugden, J. Sambrook, *Biochemistry* 12, 3055 (1973).
- [30] W. Arber, R. Yuan, T. A. Bickle, *FEBS, Proc. Meet.* 34, 3 (1975), Budapest 1974.
- [31] R. Yuan, T. A. Bickle, W. Ebbers, C. Brack, *Nature* 256, 556 (1975).
- [32] G. F. Vovis, K. Horiuchi, N. D. Zinder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3810 (1974).
- [33] P. Modrich, D. Zabel, *J. Biol. Chem.* 251, 5866 (1976).
- [34] A. Dugaiczyk, J. Hedgpeth, H. W. Boyer, H. M. Goodman, *Biochemistry* 13, 503 (1974).
- [35] H. W. Boyer, *Fed. Proc.* 33, 1125 (1974).
- [36] K. Horiuchi, N. Zinder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2555 (1975).
- [37] R. W. Blakesley, R. D. Wells, *Nature* 257, 421 (1975).
- [38] G. N. Godson, R. J. Roberts, *Virology* 73, 561 (1976).
- [39] B. Bächli, W. Arber, *Mol. Gen. Genet.* 153, 259 (1977).
- [40] H. Ikeda, J. Tomizawa, *J. Mol. Biol.* 14, 85 (1965).
- [41] W. A. Salser, *Annu. Rev. Biochem.* 43, 923 (1974).
- [42] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* 94, 441 (1975).
- [43] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560 (1977).
- [44] D. Nathans, H. O. Smith, *Annu. Rev. Biochem.* 44, 273 (1975).
- [45] J. Collins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, im Druck.
- [46] *Nature* 255, 442 (1975).