Restriktion von DNA

FI-Praktikum WS 2010/2011
„Molekulargenetik der Eukaryoten“

Entdeckung von „molekularen Scheren“: Bakterien besitzen „Restriktionsendonukleasen“

W. Arber

Restriktionsendonukleasen schneiden „eindringende“, fremde DNA in Bakterien!

Zelleigene DNA wird durch „Modifikation“ (d.h. Methylierung) vor dem Schneiden geschützt.

H.O. Smith

Reinigung des ersten Restriktionsenzyms aus Haemophilus influenzae (H*inf* I)

D. Nathans

Anwendung von Restriktionsenzym-Schnittstellen auf der DNA als „Landmarken“:
Kartierung der SV40-Virus-DNA

Nobelpreis für Medizin 1978

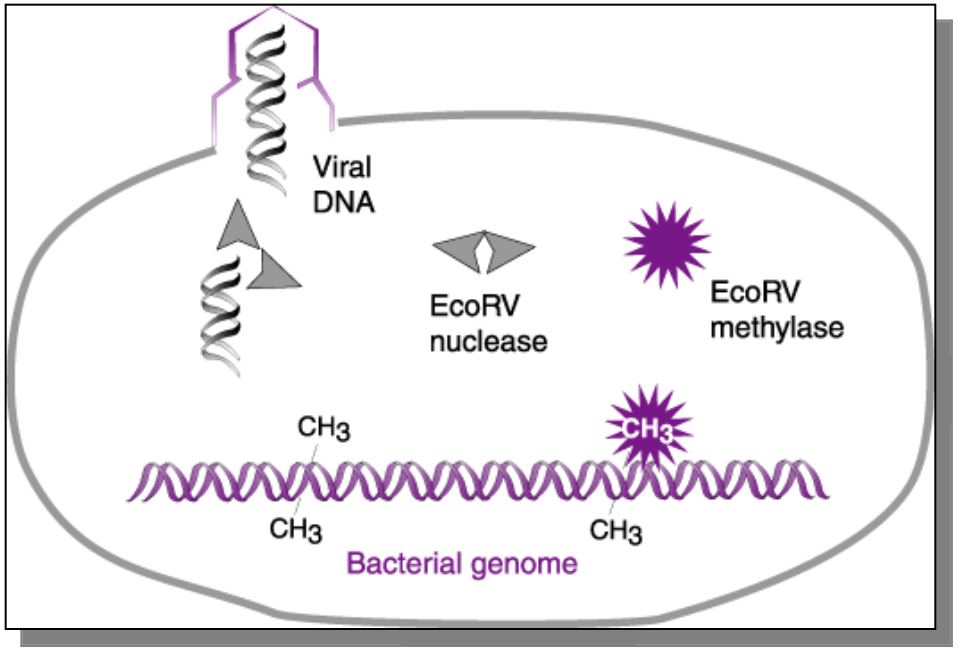
Theorie:

Bakterien-DNA:

Modifikation durch Methylierung am Cytosin oder Adenin

→ N6-Methyl-Adenin

→ 5-Methyl-Cytosin

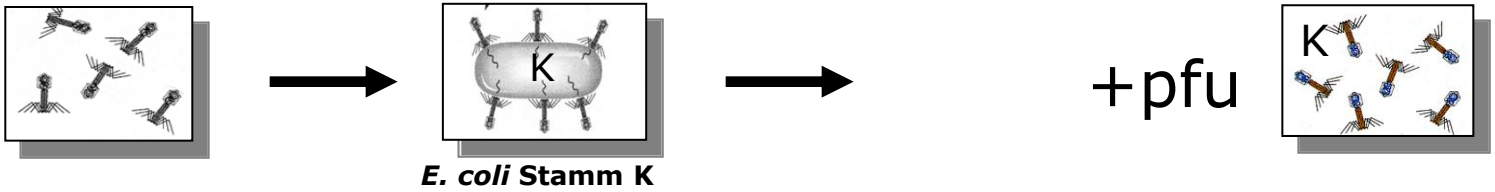


Restriktionsendonukleasen schneiden fremde, nicht modifizierte DNA

Methylierte DNA wird nicht geschnitten

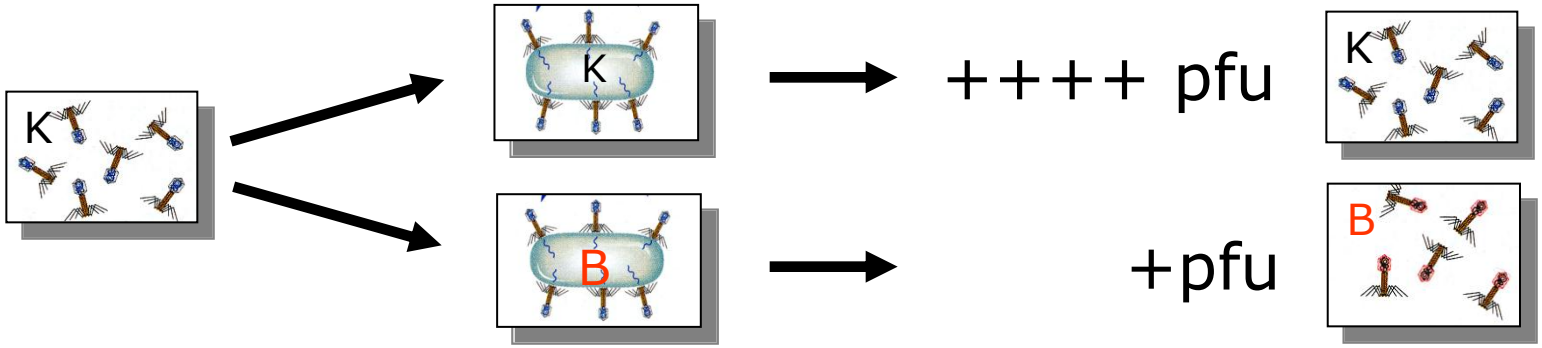
Experiment:

Infektion von *E. coli* Stamm K durch Phagen λ



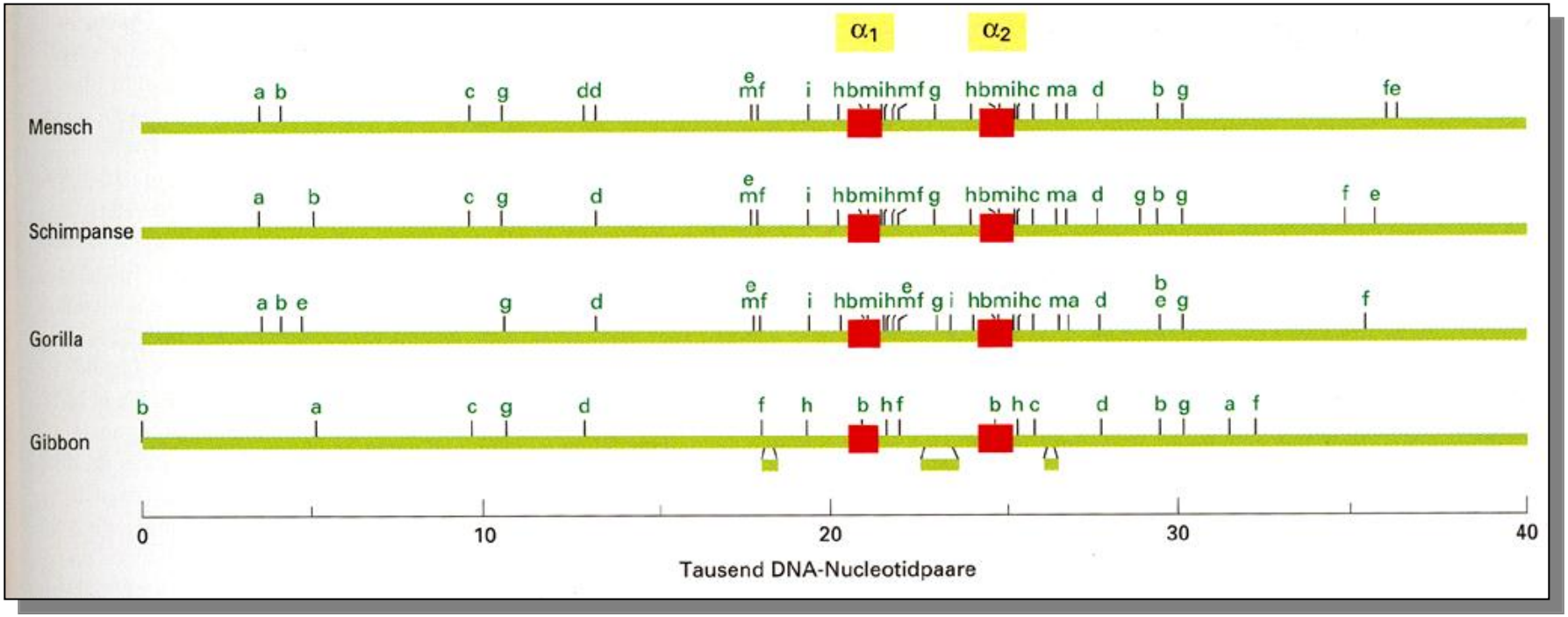
„Ernten" der überlebenden Phagen

➢Beimpfen von *E. coli* K bzw. *E. coli* B



d.h. Wachstum auf E. coli B „restringiert", während Phagen auf E. coli K angepasst sind

Restriktionsschnittstellen zur Kartierung von Genomen

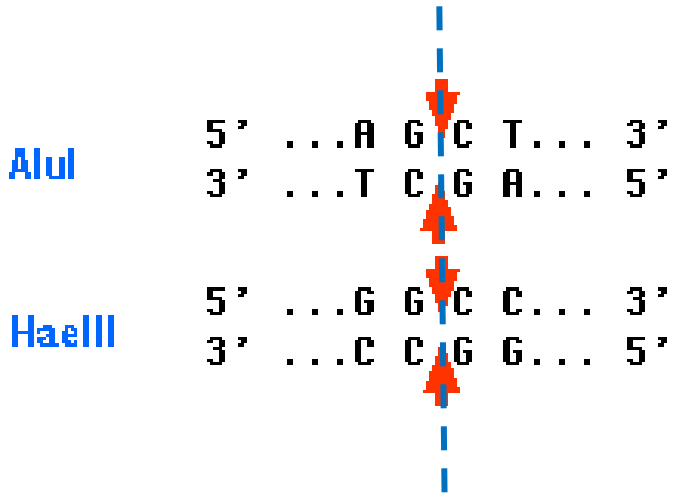


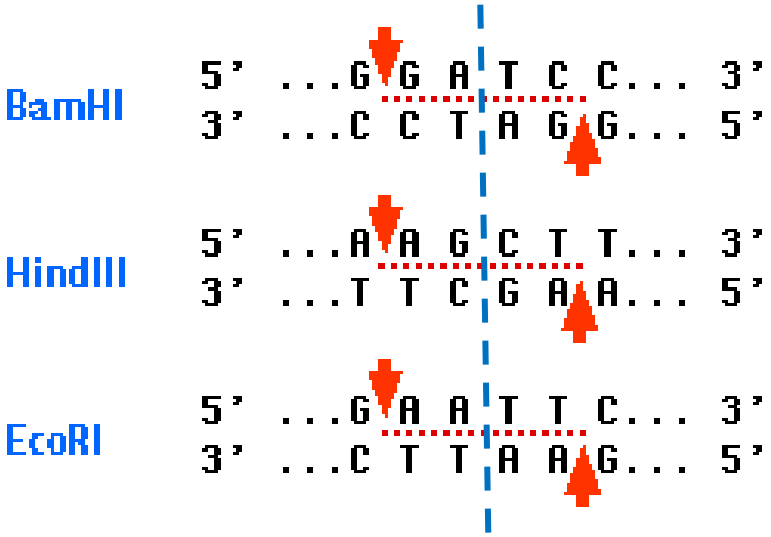
Restriktionsmuster von Schimpanse dem des Menschen am ähnlichsten

Drei Klassen von Restriktionsenzymen

	Typ I	Typ II	Typ III
Endonuclease/ Methylase	Komplex MG ca. 500000	getrennt MG ca. 100000	Komplex MG ca. 500000
Cofaktor f. Restr. " " Modif.	ATP, Mg^{++} SAM (S-Adenosylmethionin)	MG^{++} SAM	ATP, Mg^{++} SAM
Erkennungsstelle	spezifisch ca. 15 bp nicht palindromisch	spezifisch 4 - 6 bp palindromisch	spezifisch 5 bp nicht palindromisch
Schnittstelle	unspezifisch ca. 1000 bp von Erkennungsstelle	mit Erkennungsstelle identisch	spezifisch, wenige bp downstream
Beispiel	EcoB, EcoK	ca. 600	FokI, HgaI

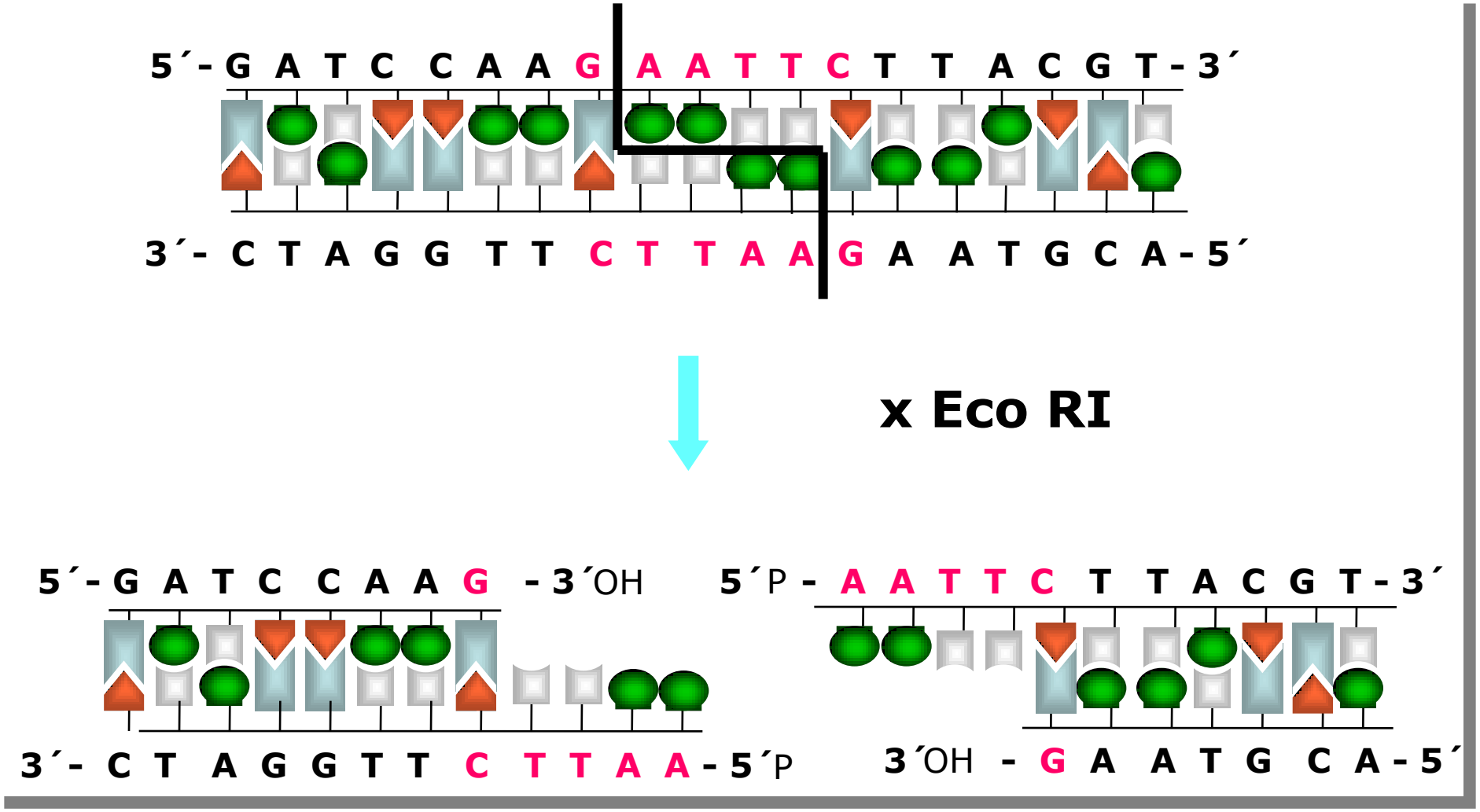
Klasse II DNA-Restriktionsenzyme





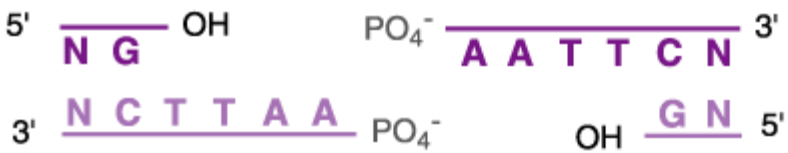
- erkennen <u>und</u> schneiden meist innerhalb einer 4 bis 6 bp langen Sequenz
- Erkennungssequenzen sind palindromisch
- entstehende Enden besitzen 3'OH bzw. 5'Phosphat
- schneiden entweder „versetzt" (macht überhängende Enden) oder auch „glatt"
- mehrere hundert Enzyme mit unterschiedlichen Erkennungs-sequenzen bekannt und kommerziell erhältlich

Klasse II DNA-Restriktionsenzyme schneiden sequenzspezifisch



Restriktionsendonukleasen können verschieden schneiden

3`-zurückhängend 5`-überhängend

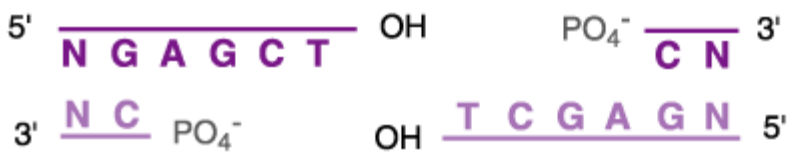


EcoRI

glattes Ende

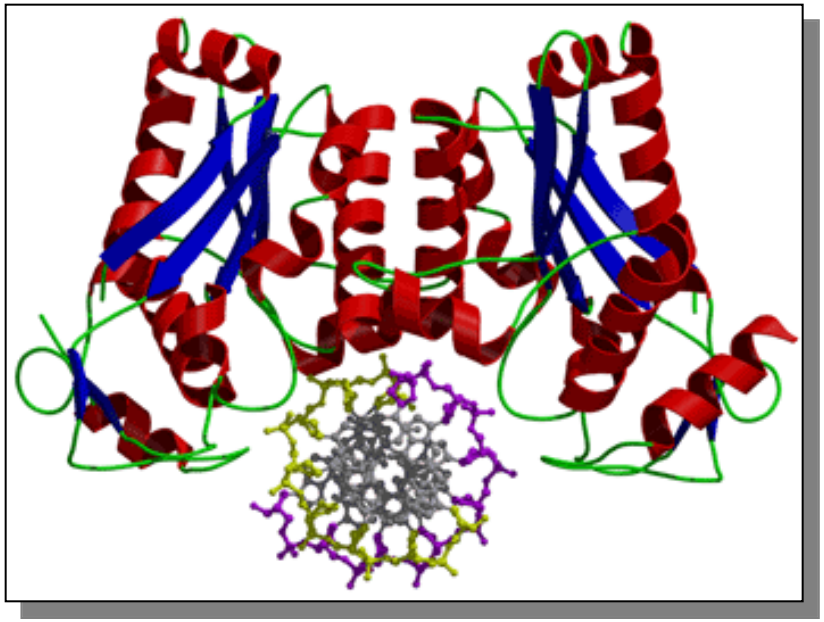
EcoRV

5`-zurückhängend 3`-überhängend

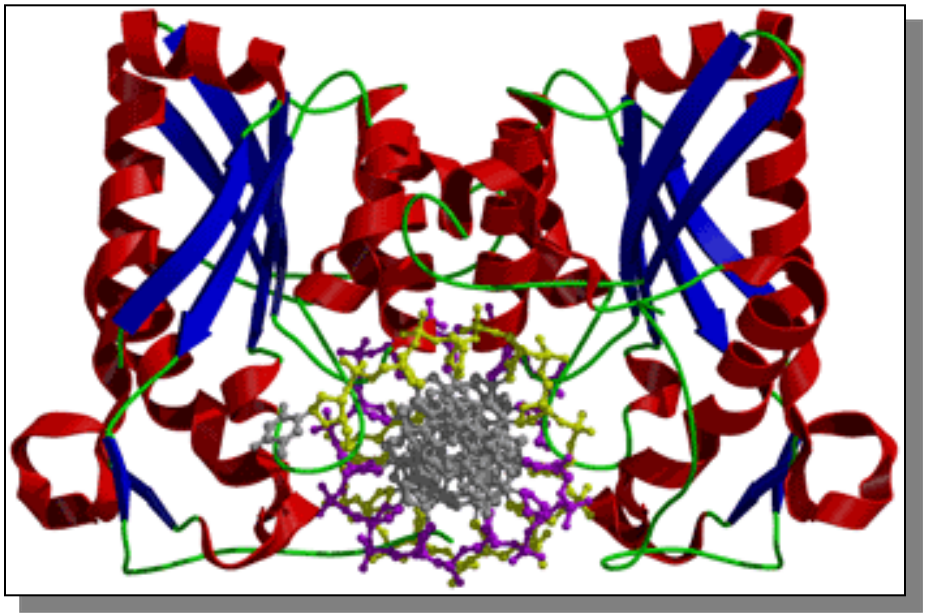


SacI

Bam HI



an beliebiger DNA-Sequenz



an seiner Schnittstelle

→ Enzym ist symmetrisches Dimer
→ sequenzspezif. Kontakt in großer Grube
→ DNA-Bindung ähnlich zu helix-turn-helix-TF
→ DNA an Erkennungsstelle leicht gekrümmt

- <u>Nomenklatur</u>: E*co* RI: E. coli Stamm R, Enzym 1
  H*in*f I: Haemophilus influenzae, Serotyp f, E1

- <u>Aktivität</u>: 1 U = Menge Enzym, die 1 µg DNA in einer Stunde vollständig spaltet

- <u>Assay</u>: DNA
  + Enzym (< 1/10 Vol. des Assays)
  + Salze (Mg^{++}, high/medium/low NaCl, pH ca.7)
  Inkubation meist bei 37°C (Enterobakterien!)
  Ausnahmen: z. B. Sma I 25°C
  Taq I 65°C
  Inaktivierung: EDTA-Zugabe u./o. 65°C-Inkub
  alternativ: Phenol-Chloroform-Extrakt.

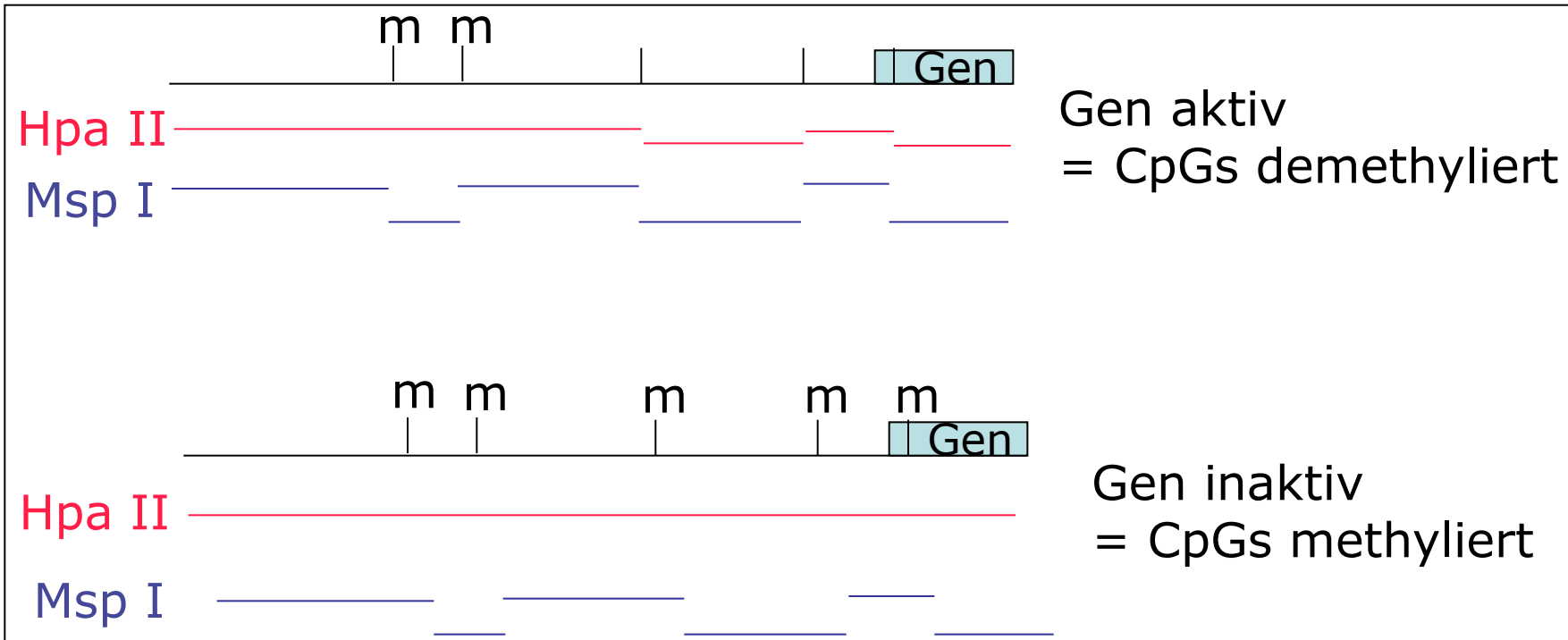
Isoschizomere

→ gleiche Erkennungsstelle
→ nicht unbedingt gleiche Schnittstelle

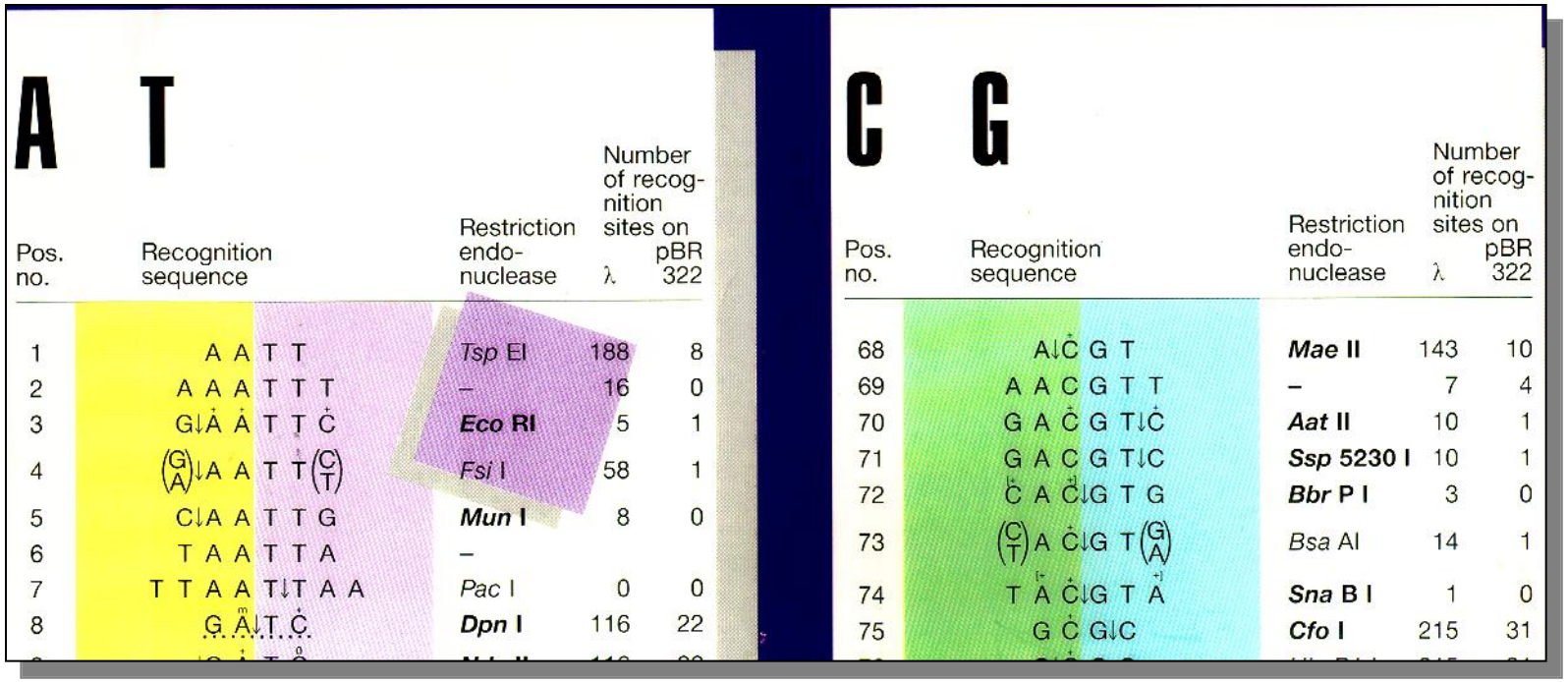
Sma I	CCCGGG
Xma III	CCCGGG
Hpa II	CCGG
Msp I	CCGG

Isoschizomere erlauben Analyse des Methylierungsstatus eines Gens

Hpa II CCGG (+) + = methylierungssensitiv
Msp I CCGG (o) o = insensitiv, schneidet also



http://rebase.neb.com



A T				
Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo-nuclease	Number of recog-nition sites on λ	pBR 322
1	A A T T	*Tsp* EI	188	8
2	A A A T T T	–	16	0
3	G↓A A T T C	***Eco* RI**	5	1
4	(G/A)↓A A T T (C/T)	*Fsi* I	58	1
5	C↓A A T T G	***Mun* I**	8	0
6	T A A T T A	–		
7	T T A A T↓T A A	*Pac* I	0	0
8	G A↓T C	***Dpn* I**	116	22

C G				
Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo-nuclease	Number of recog-nition sites on λ	pBR 322
68	A↓C G T	***Mae* II**	143	10
69	A A C G T T	–	7	4
70	G A C G T↓C	***Aat* II**	10	1
71	G A C G T↓C	***Ssp* 5230 I**	10	1
72	C A C↓G T G	***Bbr* P I**	3	0
73	(C/T) A C↓G T (G/A)	*Bsa* AI	14	1
74	T A C↓G T A	***Sna* B I**	1	0
75	G C G↓C	***Cfo* I**	215	31

\+ Inhibition bei Methylierung
0 Schneiden unbeeinflusst von Methylierung
M Schneiden erfordert Methylierung

Restriktion eukaryotischer DNA

Wie häufig schneiden Restriktionsenzyme
mit 4 bp- bzw. 6 bp-Erkennungssequenz statistisch?

Wieviele Fragmente werden ungefähr bei der Restriktion menschlicher DNA z.B. mit EcoRI entstehen?

Welches Ergebnis erwarten Sie, wenn Sie diese Anzahl von Fragmenten auf einem Agarosegel auftrennen?