

# **Einfluss gekrümmter Sequenzen auf Fernwechselwirkungen in superhelikaler DNA**

**Malte Bussiek**

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Malte Bussiek  
aus Itzehoe

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Einfluss gekrümmter Sequenzen auf Fernwechselwirkungen in superhelikaler DNA**

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski

Prof. Dr. Richard Herrmann

## Danksagung

Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Betreuung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt ihm für die guten Bedingungen im Labor, seine Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Prof. Dr. Richard Herrmann für die Übernahme des Koreferats.

Norbert Mücke danke ich für die Einarbeitung in die Rasterkraftmikroskopie, zahllose technische Ratschläge und seine Bereitschaft zu jeder denkbaren Diskussion.

Karsten Rippe danke ich für wertvolle Anregungen und Hilfen, für die er unermüdlich zur Verfügung stand.

Nathalie Brun danke ich für ihre Unterstützung bei der HPLC-Aufreinigung von superhelikaler DNA und für viele weitere Hilfen im Labor.

Ich danke Alexandra Schulz herzlich für ihr ausdauerndes Korrekturlesen und ebenfalls für viele methodische Ratschläge.

Konstantin Klenin danke ich für die Diskussionen über superhelikale DNA.

Allen Mitarbeitern, die während der Zeit dieser Arbeit der Abteilung Biophysik der Makromoleküle angehörten, danke ich für den netten Umgang miteinander.

Andreas Hunziker danke ich für die Durchführung der Sequenzierungen.

Ich danke herzlich meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Die Arbeiten fanden von Mai 1998 bis Juli 2001 in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle (Leitung Prof. Dr. Jörg Langowski) am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg statt. Das Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und durch das Deutsche Krebsforschungszentrum gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Genetische Mechanismen unter DNA-Schleifenbildung . . . . .	1
1.2 Einflüsse auf die Interaktionswahrscheinlichkeit. . . . .	3
1.2.1 Bestimmung der lokalen Konzentration in linearer DNA. . . . .	3
1.2.2 DNA-Krümmung . . . . .	5
Sequenzinduzierte Krümmung . . . . .	6
1.2.3 Superhelikale DNA . . . . .	8
1.3 DNA-Markierung über Triplexbildung . . . . .	16
1.4 Reaktionskinetiken . . . . .	18
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Materialien . . . . .	23
2.1.1 Verbrauchsmaterialien, biochemische Produkte und Laborgeräte . . . . .	23
2.1.2 Streptavidin-Peroxidase . . . . .	24
2.1.3 Die untersuchte Plasmid-DNA . . . . .	24
2.2 Mikrobiologische Verfahren . . . . .	28
2.2.1 Bakterien . . . . .	28
2.2.2 Nährmedien und Glycerinkulturen . . . . .	29
Nährmedien . . . . .	29
Glycerinkulturen . . . . .	29
2.2.3 Transformation . . . . .	30
2.2.4 Plasmidfermentation . . . . .	30
2.3 Biochemische und molekularbiologische Verfahren . . . . .	31
2.3.1 Plasmid-Präparation. . . . .	31
Minipräparation . . . . .	31
Maxipräparation. . . . .	31
HPLC-Aufreinigung. . . . .	32
2.3.2 Enzymatische Modifikationen der DNA . . . . .	32
Restriktionsspaltungen . . . . .	32
Dephosphorylierung. . . . .	33
Auffüllen von 3'-rezessiven Enden mit Klenow-Enzym . . . . .	33
Ligation . . . . .	33
2.3.3 DNA-Sequenzierreaktion . . . . .	34
2.3.4 Elektrophoresen . . . . .	35
Agarose- und native Polyacrylamidgele . . . . .	35
Chloroquingel . . . . .	36
Sequenziergel . . . . .	37
2.3.5 Sequenzspezifische Markierung der DNA . . . . .	37

## II

2. 3. 6	Gelfiltration von biotinylierter DNA . . . . .	40
2. 3. 7	Bindungsansätze mit Streptavidin-Peroxidase und biotinylierter DNA. . . . .	40
2. 3. 8	Titration von biotinylierter DNA mit Strept-POD. . . . .	40
2. 4	Quench-Flow-Reaktionen. . . . .	41
2. 4. 1	Funktionsweise des Quench-Flow-Moduls . . . . .	41
2. 4. 2	Testmessungen mit Dinitrophenylacetat. . . . .	45
	Quench-Flow-Messungen . . . . .	45
	Stopped-Flow-Messungen. . . . .	48
2. 4. 3	Reaktionen mit Strept-POD und einfach biotinylierter DNA . . . . .	49
2. 4. 4	Reaktionen mit Strept-POD und zweifach biotinylierter DNA . . . . .	51
2. 5	Rasterkraftmikroskopie . . . . .	51
2. 5. 1	Technische Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie . . . . .	52
	Messprinzip . . . . .	52
	Abbildung von Objekten . . . . .	53
	Glimmer . . . . .	54
2. 5. 2	Probenvorbereitung und Mikroskopie. . . . .	54
2. 6	Auswertungen. . . . .	56
2. 6. 1	Bestimmung der DNA-Konzentration. . . . .	56
2. 6. 2	Analyse der intrinsischen Krümmung von DNA-Sequenzen . . . . .	57
2. 6. 3	Polymerstatistische Berechnungen . . . . .	57
2. 6. 4	Berechnung des Durchmessers von Proteinen . . . . .	58

## 3. Ergebnisse

59

3. 1	Charakterisierung der untersuchten DNA . . . . .	59
3. 1. 1	Überprüfung der Klonierungen . . . . .	59
3. 1. 2	Überprüfung der <i>Cla</i> I-Insertionen. . . . .	61
3. 1. 3	Präparation der superhelikalen Plasmid-DNA . . . . .	62
3. 1. 4	Krümmungsanalyse . . . . .	63
3. 2	Markierte DNA . . . . .	65
3. 2. 1	Sequenzspezifische Biotinylierung . . . . .	65
3. 2. 2	Reaktionsprodukte zwischen biotinylierter DNA und Strept-POD . . . . .	67
	Gelelektrophoretische Darstellung . . . . .	67
	Rasterkraftmikroskopische Darstellung . . . . .	69
3. 2. 3	Berechnung des Reaktionsradius . . . . .	74
3. 3	Berechnungen von Reaktionskinetiken . . . . .	75
3. 3. 1	Analyse einer Kompetitionsreaktion . . . . .	75
3. 3. 2	Fehlerrechnung . . . . .	78
3. 3. 3	Analyse von bimolekularen Reaktionen. . . . .	78
3. 4	Bindungsaktivität von Strept-POD . . . . .	80
3. 5	Quench-Flow-Kinetiken . . . . .	83
3. 5. 1	Hydrolyse von Dinitrophenylacetat . . . . .	83
	Waschvolumen. . . . .	83
	Reaktionskinetiken der DNPA-Hydrolyse. . . . .	85

Totzeit . . . . .	88
3. 5. 2 Bindung von Strept-POD an einfach biotinylierte scDNA . . . . .	89
3. 6 Analyse der intramolekularen Vernetzungsreaktion . . . . .	92
3. 6. 1 Messprotokoll . . . . .	92
Scherkräfte im Quench-Flow-Gerät. . . . .	92
Stabilität der Komplexe bei der SFM-Präparation . . . . .	93
Spreitung der DNA auf dem Glimmer . . . . .	94
3. 6. 2 Vernetzungsraten . . . . .	94
3. 6. 3 Reaktionskonstanten und lokale Konzentrationen . . . . .	97
<b>4. Diskussion</b>	<b>101</b>
4. 1 Untersuchung einer Modellreaktion . . . . .	101
4. 2 Kalibrierung des Reaktionssystems . . . . .	103
4. 2. 1 Bindungsaktivität von Strept-POD . . . . .	103
4. 2. 2 Quench-Flow-Kinetiken. . . . .	104
Charakterisierung des Quench-Flow-Geräts . . . . .	104
Reaktionskonstante von Strept-POD und einfach biotinylierter DNA . . . . .	105
4. 3 Fernwechselwirkungen in scDNA . . . . .	106
4. 3. 1 scDNA ohne Krümmung . . . . .	106
4. 3. 2 scDNA mit Krümmung . . . . .	109
Modell einer sterischen Behinderung in scDNA mit Krümmung. . . . .	111
Krümmungsinduzierende Sequenztypen . . . . .	113
4. 4 Schlussfolgerungen. . . . .	114
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>119</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>121</b>
7. 1 Plasmidkarten. . . . .	121
7. 2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen . . . . .	123
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>



# Verzeichnis der Abbildungen

1.1	Lokale Konzentration $j_M$ für zwei Orte in der DNA . . . . .	4
1.2	Das <i>wedge</i> -Modell der sequenzinduzierten Krümmung . . . . .	7
1.3	Das <i>junction</i> -Modell der sequenzinduzierten Krümmung . . . . .	8
1.4	Entstehung von negativer Superhelizität . . . . .	10
1.5	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines superhelikalen DNA-Moleküls . . . . .	12
1.6	Brown'sche Dynamik-Simulation einer 3 kb großen scDNA . . . . .	13
1.7	Modell für den Einfluss einer Krümmung in scDNA . . . . .	15
1.8	Basenpaarungen in Triplex-DNA der Form $py \times pu \bullet py$ . . . . .	17
1.9	Reaktionsschema der intramolekularen Vernetzung über Streptavidin. . . . .	20
2.1	Klonierungsschema I. . . . .	26
2.2	Klonierungsschema II . . . . .	27
2.3	Aufbau einer TFO-Bindungsstelle . . . . .	39
2.4	Prinzip der <i>quenched-flow</i> -Technik . . . . .	41
2.5	Schematische Darstellung des Quench-Flow-Moduls QFM-5. . . . .	43
2.6	Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops. . . . .	52
2.7	Diagramm der rasterkraftmikroskopischen Darstellung eines Objekts . . . . .	54
2.8	Modell einer statistischen Kette . . . . .	57
3.1	Überprüfung der Ligation . . . . .	60
3.2	Sequenzierungen der <i>Cla</i> I-Insertionen. . . . .	61
3.3	Chloroqingel zur Bestimmung der Superhelixdichte der aufgereinigten DNA. . . . .	63
3.4	Krümmungsprofile der untersuchten Plasmide. . . . .	64
3.5	Elektrophoretischer Nachweis der sequenzspezifischen TFO-Anbindung . . . . .	66
3.6	Biotinylierungspositionen in Relation zur Krümmungsinsertion . . . . .	67
3.7	Gelelektrophoretischer Nachweis der intramolekularen Quervernetzung . . . . .	68
3.8	Strategie zur Detektion der Reaktionsprodukte zwischen zweifach biotinylierter DNA und Strept-POD auf SFM-Bildern . . . . .	69
3.9	SFM-Aufnahmen einzelner Plasmid-Moleküle mit gebundenem Strept-POD . . . . .	70
3.10	3 $\mu\text{m}^2$ -SFM-Aufnahme von pUC18-5/6A-H1/2-E mit gebundenem Strept-POD. . . . .	71
3.11	Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Distanzen $l_2$ . . . . .	73
3.12	Polyacrylamidgelelektrophorese der mit Strept-POD titrierten biotinylierten DNA . . . . .	81
3.13	Bindungskurve für einfach biotinylierte DNA und Strept-POD . . . . .	83
3.14	Waschkurve für das Quench-Flow-Modul . . . . .	84

## VI

<b>3.15</b>	Quench-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse im kontinuierlichen Modus . . . . .	85
<b>3.16</b>	Quench-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse im unterbrochenen Modus . . . . .	86
<b>3.17</b>	Abhängigkeit der apparenten Reaktionskonstanten $k_{app}$ der DNPA-Hydrolyse von der NaOH-Konzentration . . . . .	87
<b>3.18</b>	Stopped-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse . . . . .	88
<b>3.19</b>	Quench-Flow-Kinetiken der Bindung von Strept-POD an einfach biotinylierte DNA	90
<b>3.20</b>	Untersuchung von Scherkräften auf die scDNA im Quench-Flow-Gerät . . . . .	93
<b>3.21</b>	Bindung zwischen Strept-POD und biotinylierter DNA bei Ethanolzusatz . . . . .	94
<b>3.22</b>	Vernetzungsraten $P = [PS_{quer}]/[PSS]$ als Funktion der Strept-POD-Konzentration $[S]_0$	97
<b>3.23</b>	Lokale Konzentration $j_M$ in Abhängigkeit vom Grad der Asymmetrie ( $D_s$ ) der Biotinpositionen in Relation zum Krümmungszentrum . . . . .	99
<b>4.1</b>	Struktur des Komplexes aus zweifach biotinylierter DNA und Strept-POD . . . . .	112

# Verzeichnis der Tabellen

2.1	Sequenzen der <i>ClaI</i> -Insertionen . . . . .	28
2.2	Sequenzen der TFOs und Bezeichnung der zugehörigen Erkennungssequenz . . . . .	38
2.3	Sequenzprogramm 1 . . . . .	46
2.4	Sequenzprogramm 2 a) . . . . .	46
2.5	Sequenzprogramm 2 b) . . . . .	47
2.6	Sequenzprogramm 3 . . . . .	47
2.7	Sequenzprogramm 4 a) . . . . .	50
2.8	Sequenzprogramm 4 b) . . . . .	50
2.9	Sequenzprogramm 5: Gleichgewichtsreaktionen . . . . .	51
3.1	Orientierung der TFO-Bindungsstellen in den Plasmiden . . . . .	61
3.2	Verbindungs-differenzen und Superhelixdichten der untersuchten Plasmide . . . . .	63
3.3	Distanzen $l_2$ zwischen gebundenem Strept-POD und der <i>PvuII</i> -Schnittstelle . . . . .	73
3.4	Reaktionskonstanten der DNPA-Hydrolyse . . . . .	87
3.5	Totzeiten für das Quench-Flow-Gerät . . . . .	89
3.6	Konstanten der Reaktion zwischen Strept-POD und biotinylierter DNA . . . . .	91
3.7	Vernetzungsraten für alle Proben der untersuchten Plasmide . . . . .	96
3.8	Konstanten der Vernetzungsreaktion und lokale Konzentrationen . . . . .	98



# 1. Einleitung

## 1.1 Genetische Mechanismen unter DNA-Schleifenbildung

Bei vielen molekularbiologischen Prozessen wirken Proteine zusammen, die an entfernt voneinander liegende Orte in einem DNA-Molekül binden. Solche Wechselwirkungen (*cis*-Interaktionen) werden bei Eukaryoten und bei Prokaryoten häufig durch eine Schleifenbildung der DNA zwischen den gebundenen Proteinen (*DNA-looping*) vermittelt (Ptashne, 1986; Bellomy & Record, 1990; Matthews, 1992; Schleif, 1992). Bei der Regulation der Genexpression spielt dieser Mechanismus eine entscheidende Rolle: Die Transkription kann durch entfernt vom Promotor bindende Aktivatorproteine initiiert werden, die mit der am Promotor gebundenen RNA-Polymerase (bzw. den damit assoziierten Transkriptionsfaktoren) in Kontakt treten (Gralla, 1989; Matthews, 1992; von Hippel *et al.*, 1996). Diese Proteine binden an *Enhancer*-Sequenzen oder *upstream*-Elemente, die hundert bis einige tausend Basenpaare vom Promotor entfernt liegen können. Bei Prokaryoten kann die Repression der Transkription durch eine DNA-Schleifenbildung verstärkt werden, indem ein Oligomer eines Repressorproteins zwei spezifische Bindungsstellen (Operatoren) miteinander verbindet (Gralla, 1989; Bellomy & Record, 1990). *Cis*-Interaktionen unter *DNA-looping* kommen außerdem bei der Replikation und der ortsspezifischen Rekombination vor (Bellomy & Record, 1990; Schleif, 1992).

Fernwirkungen in DNA können über verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Zum Beispiel könnte ein Protein zunächst an der DNA binden und dann entlang der DNA zu einer anderen Stelle gleiten (*tracking*) (Wang & Giaever, 1988). Weiterhin könnte eine Proteinbindung eine Konformationsänderung der DNA auslösen, die sich über einen weiten Bereich fortpflanzt (Ptashne, 1986). Ein entscheidender quantitativer Hinweis auf DNA-Schleifenbildung resultierte aus Untersuchungen der Transkriptionsrepression im *lac*-Operon von *E. coli*. Bei einer Veränderung des Abstands zwischen den Operatoren änderte sich die Effektivität der Repression periodisch mit der Basenpaarzahl pro Helixwindung (Bellomy *et al.*, 1988; Law *et al.*, 1993). Eine entsprechende Beobachtung wurde auch im *ara*-Operon von *E. coli* gemacht (Dunn *et al.*, 1984). Diese Ergebnisse waren mit dem Konzept der Schleifenbildung vereinbar, weil eine mit der helikalen Windung alternierende Orientierung der Operatoren zueinander die

Wahrscheinlichkeit der *loop*-Bildung und damit die Transkriptionsrepression beeinflusste (*phasing*).

Ein weiteres Beispiel für DNA-*looping* ist die Transkriptionsaktivierung der mit der Untereinheit  $\sigma^{54}$  assoziierten RNA-Polymerase (RNAP• $\sigma^{54}$ ) in vielen Enterobakterien und Purpurbakterien. Hierbei erfordert die Transkriptionsinitiierung die Anwesenheit eines Aktivatorproteins (z. B. NtrC oder NIFA). Dieses besitzt spezifische DNA-Bindungsstellen stromaufwärts vom Promotor und katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung des offenen Promotor-Polymerasekomplexes aus dem geschlossenen Komplex (Ninfa *et al.*, 1987; Kustu *et al.*, 1991). Durch Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (SFM) konnte nachgewiesen werden, dass das an die DNA gebundene NtrC mit der am Promotor gebundenen RNAP• $\sigma^{54}$  unter Bildung einer DNA-Schleife interagiert (Su *et al.*, 1990; Rippe *et al.*, 1997a).

In Eukaryoten ist die Regulation der Genexpression wesentlich komplizierter, da eine große Anzahl von regulatorischen Proteinen einen aktiven Transkriptionskomplex bilden. Daran sind allgemein auch viele entfernt vom Promotor bindende Faktoren beteiligt (Matthews, 1992; von Hippel *et al.*, 1996). DNA-*looping* wurde in Eukaryoten z. B. bei der Transkriptionsaktivierung durch *Enhancer* von SV40 (*simian virus*) oder CMV (*cytomegalovirus*) nachgewiesen (Müller *et al.*, 1989). *Cis*-Interaktionen können im eukaryotischen Genom mit einer Modifizierung der Chromatinstruktur im Bereich der wechselwirkenden Orte einhergehen. Darauf weisen Untersuchungen der Transkriptionsaktivierung des humanen  $\epsilon$ -Globingens durch die *Enhancer*-Region HS2 (*DNase I-hypersensitive site 2*) hin (McDowell & Dean, 1999).

Aus welchem Grund haben die Organismen genetische Mechanismen unter DNA-*looping* entwickelt? Bei der prokaryotischen Transkriptionsrepression über Operatoren kann der DNA-*loop* selbst eine funktionelle Struktur sein (Bellomy & Record, 1990; Hochschild, 1990). Bei der Transkriptionsinitiierung scheint dagegen ausschließlich die Interaktion der gebundenen Proteine von Bedeutung zu sein, die über eine Schleifenbildung der DNA lediglich vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass SV40- oder CMV-*Enhancer* die Transkription eines  $\beta$ -Globingens aktivieren können, auch wenn diese mit der Promotor-DNA über eine Streptavidinbrücke verknüpft sind (Müller *et al.*, 1989). Weiterhin ist RNAP• $\sigma^{54}$  durch das Aktivatorprotein NtrC auch aus freier Lösung, d. h. in Abwesenheit von *Enhancer*-Sequenzen, aktivierbar (Ninfa *et al.*, 1987). In diesem Fall muss der Aktivator allerdings in einer wesentlich höheren Konzentration vorliegen. Dazu übereinstimmend kann RNAP• $\sigma^{54}$  aktiviert werden, wenn Promotor und *Enhancer* auf verschiedenen DNA-Molekülen liegen, sofern diese

über eine Katenanstruktur miteinander verbunden sind (Wedel *et al.*, 1990). Dasselbe wurde auch in einem eukaryotischen Promotor-*Enhancer*-System beobachtet (Dunaway & Dröge, 1989). Diese Befunde deuten darauf hin, dass durch eine *cis*-Aktivierung über DNA-*looping* die effektive Konzentration eines Aktivatorproteins in der Umgebung des Promotors erhöht werden kann. DNA-Schleifenbildung sollte dann bevorzugt sein, wenn die effektive Konzentration über der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Bindung zwischen Promotor und *Enhancer* liegt (Hochschild, 1990). Dies gilt allerdings nur, wenn die *loop*-Bildung für die Transkriptionsaktivierung geschwindigkeitsbestimmend ist (Schulz *et al.*, 2000).

Eine intramolekulare Wechselwirkung durch DNA-*looping* resultiert ausschließlich aus den zufälligen internen Bewegungen des DNA-Moleküls. Physikalisch-chemische Eigenschaften der DNA, wie die Biegungs- und Torsionsflexibilität oder elektrostatische Kräfte zwischen sich nähernden DNA-Segmenten, bestimmen darum zu einem großen Teil die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit. Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss von verschiedenen strukturellen Merkmalen der DNA auf Fernwechselwirkungen befassen, sollten allgemeine Aussagen zum *looping*-Mechanismus ermöglichen.

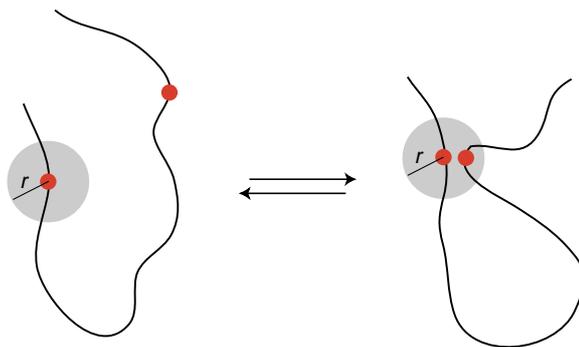
## 1.2 Einflüsse auf die Interaktionswahrscheinlichkeit

### 1.2.1 Bestimmung der lokalen Konzentration in linearer DNA

Ein quantitatives Maß für die Interaktionswahrscheinlichkeit ist die molare lokale Konzentration  $j_M$ . Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich ein Ort in der DNA in unmittelbarer Nähe zu einem zweiten Ort auf demselben DNA-Molekül befindet. Die Wahrscheinlichkeit ist durch die Verteilung der Konformationen bestimmt, die die DNA im thermodynamischen Gleichgewicht einnehmen kann (Jacobson & Stockmayer, 1950; Rippe *et al.*, 1995). Experimentell wurde  $j_M$  bisher für lineare DNA mittels der Zyklisierungsreaktion von DNA-Fragmenten mit Ligase bestimmt (Dugaiczky *et al.*, 1975; Shore *et al.*, 1981; Shore & Baldwin, 1983). Über die durch Tn3 katalysierte ortsspezifische Rekombination wurde  $j_M$  ebenfalls für lineare DNA und auch für Chromatin gemessen (Ringrose *et al.*, 1999). In diesen Reaktionssystemen war eine Bestimmung von  $j_M$  möglich, weil die *loop*-Bildung geschwindigkeitsbestimmend war.

$j_M$  kann außerdem mit polymerstatistischen Modellen berechnet werden (Rippe *et al.*, 1995). Im Modell einer statistischen Kette wird das Molekül als eine Kette von frei gegeneinander

beweglichen Segmenten betrachtet, deren Länge durch die Persistenzlänge der DNA gegeben ist. Die Persistenzlänge beschreibt die Flexibilität eines Polymers (Hagerman, 1988). Dieses Modell gilt für lange DNA-Moleküle (ab 1000 bp); für kürzere Moleküle wird das Modell eines elastischen Stabes verwendet, in welchem die Verbiegungen des DNA-Strangs nicht aus beweglichen Verbindungen zwischen starren Segmenten hervorgehen, sondern kontinuierlich sind. Kürzlich wurde ein kombiniertes Modell zur Berechnung von  $j_M$  für alle DNA-Längen entwickelt (Ringrose *et al.*, 1999; Rippe, unveröffentlicht). Für einen definierten Reaktionsradius  $r$  lässt sich  $j_M$  aus dem berechneten Anteil der DNA-Konformationen ableiten, bei denen sich ein Ort innerhalb eines Kugelvolumens mit Radius  $r$  um einen zweiten Ort befindet (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1** Lokale Konzentration  $j_M$  für zwei Orte in der DNA

Die Darstellung zeigt zwei zufällige DNA-Konformationen. Rechts befinden sich die rot gekennzeichneten Orte innerhalb des definierten Reaktionsradius  $r$ .

Diese Analysen demonstrieren die intramolekulare Kontaktwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Länge des DNA-Bereichs zwischen interagierenden Orten. Die Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Befunden ist dabei sehr gut. Für lineare DNA besteht eine maximale Interaktionswahrscheinlichkeit bei einer Distanz von etwa 500 bp ( $j_M \sim 1 \cdot 10^{-7}$  M). Mit geringer werdender Distanz fällt  $j_M$  sehr schnell ab, da die Steifheit des DNA-Moleküls die Kontaktwahrscheinlichkeit begrenzt. *Cis*-Aktivatorproteine binden typischerweise in einer Entfernung vom Promotor unterhalb oder weit oberhalb von 500 bp, so dass offenbar nicht der für die höchste Kontaktwahrscheinlichkeit optimale Abstand ausgenutzt wird. Die Distanz zwischen den genannten RNAP• $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren und *Enhancern* liegt z. B. im Bereich von 100-150 bp (Kustu *et al.*, 1991) oder 1.5 kb (Belitsky & Sonenshein, 1999). Durch die im Folgenden aufgeführten Modifikationen der

DNA-Konformation, Krümmung und Superhelizität, kann die Kontaktwahrscheinlichkeit jedoch erheblich gesteigert werden.

## 1. 2. 2 DNA-Krümmung

Eine entscheidende Konformationsänderung der DNA ist eine zentral zwischen interagierenden Orten eingefügte lokale Krümmung. Durch sie wird die Verbiegungsenergie der DNA herabgesetzt, so dass sich die Orte mit höherer Wahrscheinlichkeit annähern. DNA-Krümmung kann sequenzinduziert sein (siehe unten) oder durch sog. Architekturproteine hervorgerufen werden. Das prokaryotische Protein IHF (*integration host factor*) bindet spezifisch an einen 35 bp-Bereich, den es U-förmig um etwa  $160^\circ$  verbiegt (Rice *et al.*, 1996). Das Protein erhielt seinen Namen daher, weil es ursprünglich als ein für die Integration von  $\lambda$ -DNA in das *E.coli*-Chromosom erforderlicher Wirtsfaktor beschrieben wurde (Nash & Robertson, 1981). Es ermöglicht hier durch eine Verbiegung der DNA die Bildung des  $\lambda$ -Intasoms, in welchem das Integraseprotein an mehreren Stellen mit der  $\lambda$ -DNA interagiert (Goodman & Nash, 1989). Weiterhin wird die Transkriptionsaktivierung von RNAP• $\sigma^{54}$  deutlich durch IHF gesteigert, das eine Bindungsstelle zwischen Promotor und den *Enhancer*-Sequenzen besitzt (Hoover *et al.*, 1990; Kustu *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1992; Molina-López *et al.*, 1994). Durch einen Austausch der IHF-Bindungsstelle gegen andere Krümmungsmodule konnte nachgewiesen werden, dass die ausschließliche Funktion des Proteins in diesen Systemen die Verbiegung der DNA ist. So stimuliert eine sequenzinduzierte Krümmung die Transkription durch RNAP• $\sigma^{54}$  mit annähernd gleicher Effektivität wie IHF (Molina-López *et al.*, 1994). Bei der  $\lambda$ -Integration konnte die durch IHF erzeugte Krümmung ebenfalls gegen eine sequenzinduzierte Krümmung oder eine durch CRP (*cyclic AMP receptor protein*) hervorgerufene Krümmung ersetzt werden, ohne dass die Rekombination verhindert wurde (Goodman & Nash, 1989). Auch das bei der Transkriptionsaktivierung beteiligte Protein CAP (*catabolic aktivator protein*) wurde funktionell durch eine sequenzinduzierte Krümmung ersetzt (Bracco *et al.*, 1989).

In Eukaryoten besitzen ebenfalls verschiedene Proteine DNA-krümmende Eigenschaften. Der häufigste chromosomale Protein-DNA-Komplex ist das Nukleosom, von dem die DNA-Enden in einem Winkel von etwa  $40-60^\circ$  abgehen. Über die Nukleosomenpositionierung durch chromatinmodulierende Proteine kann deshalb die Chromatinfiber verbogen werden. Weitere eukaryotische krümmende Proteine sind HMG (*high mobility group*) (Gilardi & Perricaudet, 1986; Chase *et al.*, 1999) oder TBP (*TATA-binding protein*) (Kim *et al.*, 1993).

Nach numerischen Berechnungen steigert eine Krümmung in linearer DNA  $j_M$  um mehrere Größenordnungen bei kurzen Distanzen zwischen interagierenden Orten (150-250 bp) und um den Faktor 3-4 bei etwa 400-500 bp. Ab etwa 1000 bp besteht jedoch kein nennenswerter Einfluss mehr (Levene & Crothers, 1986; Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998).

### Sequenzinduzierte Krümmung

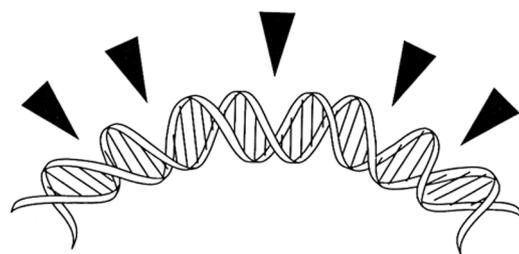
Eine durch physikalisch-chemische Eigenschaften der DNA hervorgerufene Verbiegung der Helixachse wird als sequenzinduzierte oder intrinsische Krümmung bezeichnet. Sie ist von einer Verbiegung durch externe Kräfte wie z. B. durch Proteine zu unterscheiden (Diekmann, 1987a). Intrinsische Krümmung wurde erstmals in einem Restriktionsfragment der mitochondrialen Kinetoplast-DNA des Protozoons *Leishmania tarentolae* entdeckt (Marini *et al.*, 1982). Das Fragment wanderte in Polyacrylamidgelen langsamer als aufgrund der Sequenzlänge zu erwarten war, in Agarosegelen jedoch an die 'korrekte' Position. Dieses als Gelanomalie bezeichnete Verhalten wurde einer intrinsischen Krümmung der DNA zugeschrieben. In dem Fragment wurde ein Sequenzbereich mit Blöcken von Adenin-Thyminbasenpaaren (im Folgenden als A-Blöcke bezeichnet) identifiziert, die (i) in Phase mit den helikalen Windungen der DNA angeordnet waren und in denen (ii) denen die Adenine immer im selben DNA-Strang lagen. In weiteren Untersuchungen wurde dieser Bereich als Ursache der Gelanomalie erkannt (Wu & Crothers, 1984). Anhand von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden wurde festgestellt, dass die Anomalie eine Anordnung der A-Blöcke in helikaler Phase voraussetzt (Hagerman, 1985). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Effekt mit der Länge der Adeninoligomere bis zu  $A_n$  ( $n = 6$ ) stärker wird (Diekmann, 1986; Diekmann, 1987b; Koo *et al.*, 1986).

Dass derartige Sequenzen tatsächlich gekrümmt sind, wurde auf verschiedene Weise gezeigt (zusammengefasst in Diekmann (1987a)). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erschien ein 219 bp großes lineares Fragment, das 18 A-Blöcke in helikaler Phase enthielt und glatte Enden aufwies, mit großer Häufigkeit als ringförmig geschlossen. Aus dieser Beobachtung wurde ein Verbiegungswinkel pro A-Block von  $20^\circ$  abgeleitet. Ein anderer Nachweis ergibt sich aus der Ringschlussreaktion über Ligase. Wird dabei lineare DNA als Substrat eingesetzt, die A-Blöcke enthält, entsteht bei wesentlich kürzeren Fragmenten zirkuläre DNA als bei statistischer DNA, weil die Krümmung die Kontaktwahrscheinlichkeit der DNA-Enden steigert.

Der Verbiegungswinkel von A-Blöcken wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt. Die Zyklisierungswahrscheinlichkeit von A-Block enthaltenden Fragmenten wurde gemessen und dann an Computer-Simulationen der Zyklisierung für verschiedene Winkel angepasst (Koo *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1999). Danach beträgt der Verbiegungswinkel 17-21° pro A<sub>6</sub>-Block und 18.9° pro A<sub>5</sub>-Block. Messungen des End-zu-Endabstands von Oligonukleotiden durch FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer), der eine Beobachtung der DNA in freier Lösung erlaubt, zeigten eine starke Salzabhängigkeit des Krümmungsgrades. Dabei wurden Winkel von 23°-41° pro A<sub>6</sub>-Block bestimmt (Tóth *et al.*, 1998).

Es existieren verschiedene Modelle zur Erklärung der sequenzinduzierten Krümmung. Das *wedge*<sup>1</sup>-Modell nimmt an, dass d(ApA)-Dinukleotide im Vergleich zu allen anderen Dinukleotiden einen besonders starken Verkippungswinkel aufweisen. Allgemein ergibt sich die Richtung der Verkippung eines Basenpaares gegen ein anderes aus zwei Komponenten, einer Verdrehung in Richtung der Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare (*tilt angle*<sup>2</sup>) und einer Verdrehung im 90°-Winkel dazu (*roll*). Weist der Winkel von aufeinander folgenden Dinukleotidschritten in dieselbe Richtung, wie bei den in Phase angeordneten A-Blöcken, wird nach diesem Modell die Helixachse gekrümmt (Trifonov & Sussman, 1980) (Abb. 1.2).

**Abb. 1.2** Das *wedge*-Modell der sequenzinduzierten Krümmung  
In diesem Modell wird die Krümmung als eine durch Keile verursachte Verkippung der d(ApA)-Dinukleotide angesehen. Die Summe der einzelnen Keilwinkel ergibt die gesamte Verbiegung der Helixachse (entnommen aus Sinden (1994)).



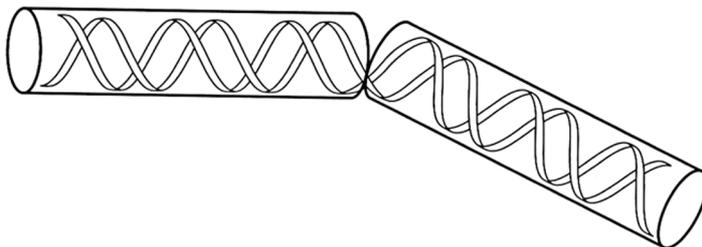
Das *junction*-Modell geht davon aus, dass A-Blöcke eine andere DNA-Konformation als die normale B-Form annehmen (B'-DNA). Die Verbindungsstelle zwischen der normalen B-DNA und der durch die A-Blöcke veränderten Konformation weist dabei einen bestimmten Verbie-

1. *wedge*: engl. Keil

2. *tilt angle*: engl. Neigungswinkel

gungswinkel auf. Die Verbiegung wird vor allem durch die Verbindung am 3'-Ende der A-Blöcke verursacht (Koo *et al.*, 1986) (Abb. 1.3).

Beide Modelle lassen sich mit den meisten experimentellen Befunden vereinbaren. Es zeigte sich allerdings, dass der Verbiegungswinkel von den am 3'- und am 5'-Ende der A-Blöcke angrenzenden Basenpaaren abhängig sein kann. Dies widersprach zunächst beiden Modellen, da ausschließlich die Anwesenheit der A-Blöcke in helikaler Phase die Krümmung verursachen sollte. Zum Beispiel war bei einem Vergleich der Gelanomalie von Oligonukleotiden, die sich lediglich in der Orientierung eines Sequenzmotivs unterschieden (5'-A<sub>n</sub>T<sub>n</sub>-3' oder 5'-T<sub>n</sub>A<sub>n</sub>-3'), die eine Spezies gekrümmt, während die andere ungekrümmt war (Hagerman, 1986). Beide Modelle wurden dann durch bestimmte Annahmen für die Komponenten *roll* und *tilt* der Verbindung zwischen A-Block und den daran angrenzenden Basenpaaren verfeinert (Ulanovsky *et al.*, 1986; Koo & Crothers, 1988).



**Abb. 1.3** Das *junction*-Modell der sequenzinduzierten Krümmung  
Die Helixachse erfährt einen Knick an der Verbindungsstelle zwischen zwei sich in der Helixstruktur leicht unterscheidenden Sequenzbereichen. Die Bereiche selbst sind ungekrümmt (entnommen aus Sinden (1994)).

### 1. 2. 3 Superhelikale DNA

In Prokaryoten können *Enhancer* in einer Entfernung von mehreren hundert Basenpaaren vom Promotor liegen, was z. B. in einem  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gen in *Bacillus subtilis* nachgewiesen wurde (Belitsky & Sonenshein, 1999). In Eukaryoten binden viele Aktivatorproteine ebenfalls in sehr großen Entfernungen vom Promotor (von Hippel *et al.*, 1996). Aufgrund der bisher genannten Eigenschaften der DNA ist für diese Distanzen die lokale Konzentration  $j_M$  vergleichsweise gering und kann auch durch DNA-Krümmung nicht nennenswert gesteigert werden (Rippe *et al.*, 1995). Ein strukturelles Merkmal von DNA *in vivo* ist die Superhelizität, die einen weiteren starken Einfluss auf die Kontaktwahrscheinlichkeit haben kann.

DNA wird als superhelikal bezeichnet, wenn die DNA-Doppelhelixachse zu einer höheren Konformation im Raum gewunden ist. Im eukaryotischen Chromatin ist der DNA-Strang um die Histonoktamere gewunden und bildet dabei eine linkshändige solenoidale Superhelix (Richmond *et al.*, 1984). In Prokaryoten und tlw. in Eukaryoten steht die DNA aufgrund eines Windungsdefizits der DNA-Doppelhelix unter einer Torsionsspannung, die durch eine Verwindung der Doppelhelixachse kompensiert wird (s. unten). Ringförmige DNA wie Plasmide, Bakterienchromosomen, die DNA der Mitochondrien und Chloroplasten sowie einige virale Genome erhalten dadurch eine in sich verwundene, plektonemische Konformation (Abb. 1.4 C). Die Superhelizität wird durch Topoisomerasen, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorkommen, in die DNA eingeführt und reguliert (Wang, 1985). Die eukaryotische Chromatinfiber ist in schleifenförmige Domänen organisiert, deren Basen mit Topoisomerasen assoziiert sind (Laemmli *et al.*, 1992). Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass Bereiche des Chromatins unter Torsionsspannung stehen können, in denen Transkription stattfindet oder die in aktiven Genen enthalten sind (z. B. DNase-hypersensitive Stellen) (Wang, 1985).

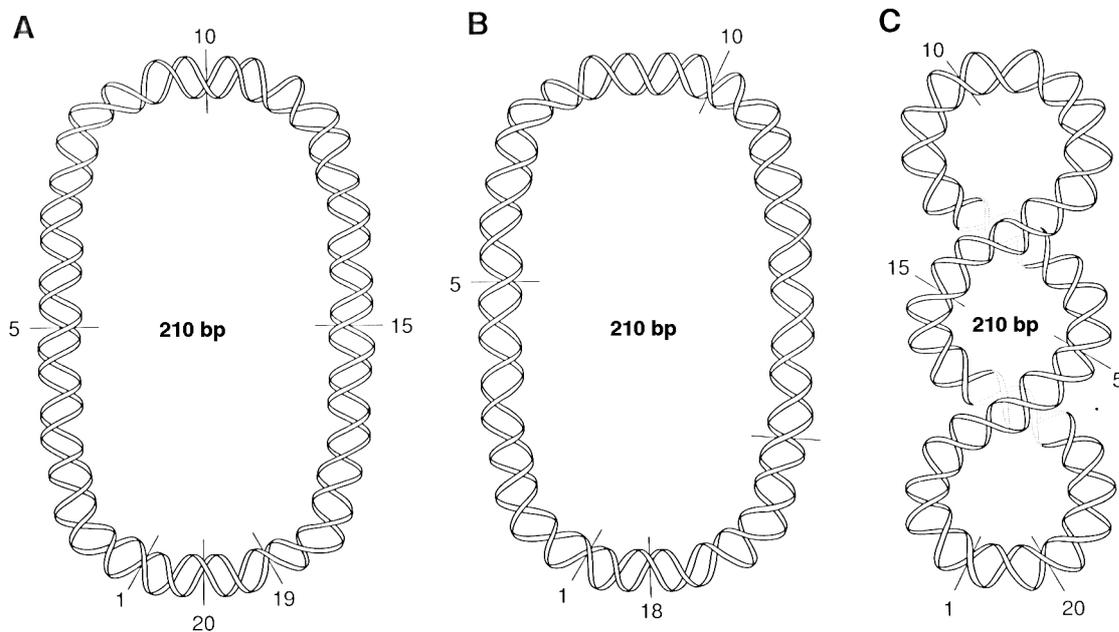
Superhelizität ist eine topologische Eigenschaft der DNA, die über die Verbindungszahl  $Lk$  quantitativ beschrieben wird. Die Zahl gibt an, wie oft die Einzelstränge der DNA-Doppelhelix umeinander gewunden sind, wenn das Molekül in einer zweidimensionalen Ebene festgehalten würde (Sinden, 1994).  $Lk$  ist für jedes ringförmig geschlossene Molekül eine unveränderliche Größe; nur durch eine Spaltung des Phosphatrückgrats in einem Strang können Windungen eingefügt oder entfernt werden. Der  $Lk$ -Wert kann sich deshalb nur ganzzahlig ändern. Moleküle, die sich im  $Lk$ -Wert unterscheiden, werden als Topoisomere bezeichnet. Für ein nicht unter Torsionsspannung stehendes (relaxiertes) Molekül gilt

$$Lk = Lk_0 = \frac{N}{10.5}, \quad (1.1)$$

wobei  $N$  die Anzahl der Basenpaare des Moleküls ist. 10.5 entspricht der Anzahl der Basenpaare pro helikaler Umdrehung in entspanntem Zustand der DNA (Wang, 1979). Abbildung 1.4 A zeigt ein ringförmiges Molekül, in dem diese helikale Wiederholung nach Gleichung 1.1 gegeben ist ( $N = 210$ ,  $Lk = 20$ ).

Obwohl  $Lk$  unveränderlich ist, kann sich dennoch die Anzahl der helikalen Windungen ändern, was durch die Größe *Twist* ( $Tw$ ) ausgedrückt wird.  $Tw$  ist als die Anzahl der Windungen der DNA-Stränge um die Doppelhelixachse definiert. Das Molekül in Abb. 1.4 B besitzt gegenüber dem relaxierten Molekül gleicher Größe eine geringere Verbindungszahl ( $Lk = 18$ ) und damit ein Windungsdefizit mit der Verbindungsdifferenz  $\Delta Lk$ :

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 \quad (1.2)$$



**Abb. 1.4** Entstehung von negativer Superhelizität

A) relaxiertes Molekül ( $Lk = 20$ ,  $Tw = 20$  und  $Wr = 0$ ); B) Molekül mit einem Windungsdefizit ( $Lk = 18$ ,  $Tw = 18$  und  $Wr = 0$ ). Dieses Molekül steht unter Torsionsstress und kann die dem relaxierten Molekül entsprechende offene Konformation nur aufrechterhalten, solange es in der zweidimensionalen Bildebene fixiert wird. Es nimmt in Lösung die in (C) gezeigte verwundene Struktur mit zwei superhelikalen Windungen an. Das Windungsdefizit von  $\Delta Tw = -2$  wird dadurch ausgeglichen ( $Lk = 18$ ,  $Tw = 20$  und  $Wr = -2$ ). Darstellung aus Sinden (1994).

In diesem Molekül befinden sich damit mehr als 10.5 bp in einer Helixwindung. Der Zustand ist energetisch ungünstig und wird deshalb durch die in Abb. 1.4 C gezeigte Superspiralisierung kompensiert. Es liegen dann, wie im relaxierten Molekül, wieder  $Tw = 20$  Windungen vor und es entstehen zusätzlich zwei superhelikale Windungen, deren Anzahl mit *Writhe* ( $Wr$ ) bezeichnet wird.  $Wr$  gibt die Anzahl der Windungen der DNA-Doppelhelixachse im Raum an.

Die Topologie eines ringförmigen DNA-Moleküls kann allgemein wie folgt beschrieben werden (Cozzarelli *et al.*, 1990):

$$Lk = Tw + Wr \quad (1.3)$$

$Wr$  erhält im genannten Beispiel ein negatives Vorzeichen, weil die superhelikalen Windungen durch ein Windungsdefizit erzeugt wurden. Das Molekül ist damit negativ superspiralisiert.  $Wr$  und  $Tw$  sind außerdem ineinander umwandelbar. Tatsächlich verteilt sich die Torsionsspannung auf beide Größen, wobei der Hauptteil im *Writhe* liegt (Adrian *et al.*, 1990; Boles *et al.*, 1990; Bednar *et al.*, 1994).

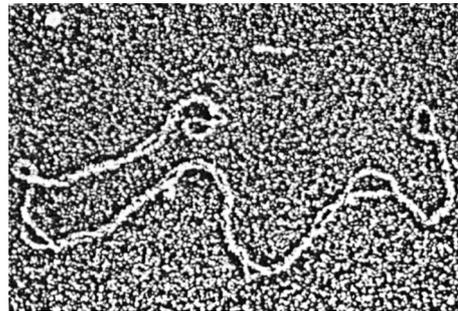
Die Verbindungsdifferenz wird über die spezifische Superhelixdichte  $\sigma$  auf die DNA-Länge normiert:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \quad (1.4)$$

$\Delta Lk$  und damit  $\sigma$  können experimentell bestimmt werden. Topoisomere wandern in Agarosegelen, denen der DNA-entwindende Interkalator Chloroquin zugesetzt wird, aufgrund ihres unterschiedlichen Kompaktierungsgrades verschieden schnell. Da sich Topoisomere nur ganzzahlig in den  $\Delta Lk$ -Werten unterscheiden, sind sie als einzelne Banden erkennbar. Durch Abzählen der Topoisomerbanden kann die DNA bestimmten  $\Delta Lk$ -Werten zugeordnet werden (*band counting*-Methode, Keller (1975), siehe 2.3.4). Typische Superhelixdichten  $\sigma$  von Plasmid-DNA aus *E. coli* sind -0.05 bis -0.06.

Superhelikale DNA ist zu einem hohen Grad kompaktiert. Bei der in Abb. 1.5 gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahme eines etwa 6000 bp großen superhelikalen Plasmids ist die enge Verwindung der sich in der Superhelix gegenüberliegenden DNA-Stränge erkennbar. Diese plektonemische Konformation dominiert in Lösung nach Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) (Langowski & Giesen, 1989), Neutronenstreuung (Hammermann *et al.*, 1998) und wurde in verschiedenen elektronenmikroskopischen und rasterkraftmikroskopischen Analysen nachgewiesen (Laundon & Griffith, 1988; Adrian *et al.*, 1990; Boles *et al.*, 1990; Rippe *et al.*, 1997b; Lyubchenko & Shlyakhtenko, 1997). Entfernt voneinander liegende Orte befinden sich darum mit größerer Wahrscheinlichkeit in der Nähe zueinander als in linearer oder nicht unter Torsionsspannung stehender ringförmiger DNA. Nach numerischen

Berechnungen kann  $j_M$  bei einer Erhöhung der Superhelixdichte  $\sigma$  von 0 bis -0.06 um bis zu zwei Größenordnungen gesteigert werden (Vologodskii *et al.*, 1992). Weitere Berechnungen zeigen, dass die Kinetik von intramolekularen Kontakten durch Superhelizität deutlich schneller sein kann (Jian *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Die Aktivierungsraten von RNAP• $\sigma^{54}$  durch *Enhancer* liegen entsprechend dieser theoretischen Vorhersagen in scDNA deutlich über denen in linearer DNA (Santero *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 2000).

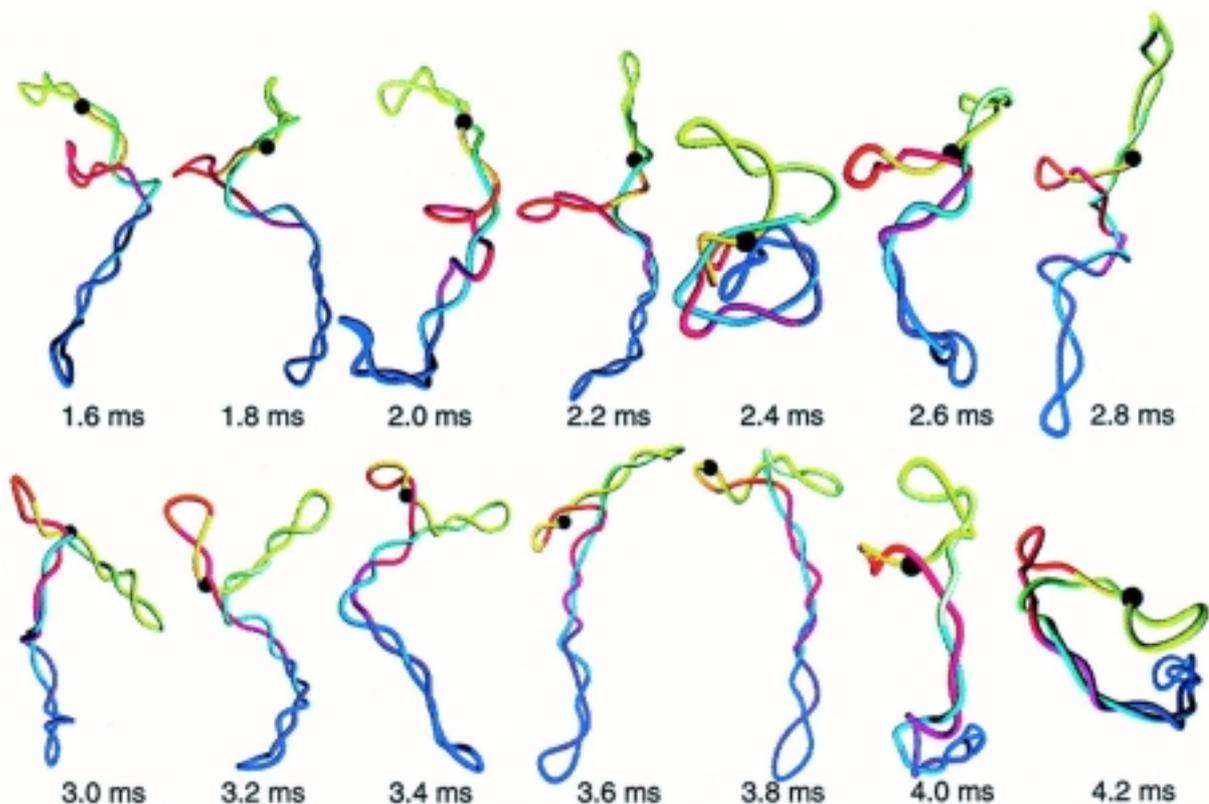


**Abb. 1.5** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines superhelikalen DNA-Moleküls  
Entnommen aus (Laundon & Griffith, 1988).

Die dreidimensionalen Konformationen von scDNA und die Dynamik, mit der Konformationsänderungen stattfinden, bestimmen hier die intramolekulare Kontaktwahrscheinlichkeit. Die lokale Konzentration kann für scDNA daher nicht mit den unter 1.2.1 genannten Modellen einer statistischen Kette oder eines elastischen Stabes berechnet werden, die nur die Flexibilität der DNA berücksichtigen. Mit computergestützten Modellen können jedoch scDNA-Konformationen simuliert werden, wobei die für scDNA entscheidenden Parameter wie z. B. elektrostatische Kräfte zwischen sich nähernden DNA-Bereichen berücksichtigt werden können. Mit Monte-Carlo-Modellen wird ein Ensemble von DNA-Konformationen im thermodynamischen Gleichgewicht erzeugt, aus dem die lokale Konzentration  $j_M$  eines Ortes in der Umgebung eines zweiten abgeleitet werden kann (Vologodskii *et al.*, 1992; Klenin *et al.*, 1995). Brown'sche Dynamik-Simulationen erlauben eine zeitabhängige Berechnung von Konformationsänderungen (Chirico & Langowski, 1996). Damit kann die Kinetik von intramolekularen Kontakten berechnet werden. In 2000-3000 kb großen scDNAs erfolgt danach eine erste Kollision entfernt liegender Orte in einem Zeitbereich von durchschnittlich 1-3 ms (Klenin & Langowski, 2001b; Jian *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001).

In scDNA können Verzweigungen auftreten, deren Häufigkeit nach elektronenmikroskopischen Analysen von der DNA-Länge (Boles *et al.*, 1990) und nach Monte Carlo-Simulationen

außerdem von der Superhelixdichte (Vologodskii *et al.*, 1992; Klenin *et al.*, 1995) abhängig ist. Es wird weiterhin durch numerische Simulationen vorausgesagt, dass sich der DNA-Strang entlang der Superhelixachse bewegen kann, was als *slithering*<sup>3</sup> bezeichnet wurde (Vologodskii *et al.*, 1992; Wedemann *et al.*, 1998). Dies führt in einer eindimensionalen Diffusionsbewegung zu Konformationen, in denen sich zwei wechselwirkende Orte in der Superhelix direkt gegenüberliegen und miteinander reagieren können. Solche Bewegungen erfolgen wahrscheinlich, indem gleichzeitig durch entstehende oder verschwindende Verzweigungen Teile der DNA aus dem Hauptast absorbiert bzw. an diesen abgegeben werden (Chirico & Langowski, 1996; Jian *et al.*, 1998; Klenin & Langowski, 2001a). Abbildung 1.6 zeigt eine Computersimulation, die Konformationsänderungen von scDNA veranschaulicht.



**Abb. 1.6** Brown'sche Dynamik-Simulation einer 3 kb großen scDNA

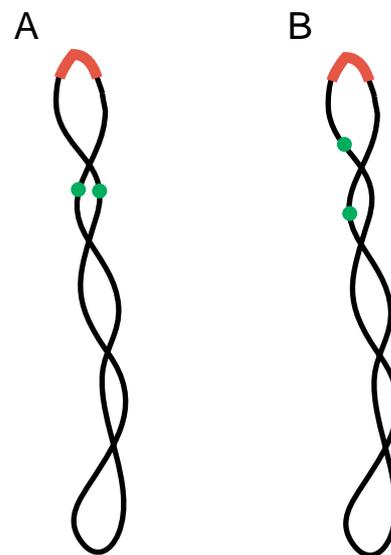
Die Konformationsänderungen des Moleküls können in 0.2 ms-Schritten verfolgt werden. Die Farben entsprechen bestimmten DNA-Bereichen. Die durch eine schwarze Kugel gekennzeichnete Position bewegt sich langsam entlang der Superhelixkontur und gerät so in die Nähe verschiedener Orte in der DNA (entnommen aus Huang *et al.* (2001)).

<sup>3</sup>.*slithering*: engl. gleiten

Die lokale Konzentration oder intramolekulare Geschwindigkeitskonstanten in scDNA sind nur selten experimentell untersucht worden.  $j_M$  wurde *in vivo* mittels der Transkriptionsrepression über interagierende Operatoren abgeschätzt. Es wurde der bereits genannte *phasing*-Effekt quantitativ charakterisiert, wobei die lokale Aktivität eines an einen Operator gebundenen Repressorproteins in der Umgebung des zweiten Operators um etwa den Faktor 10 variierte und dabei deutlich höher war als in linearer DNA (Law *et al.*, 1993). In kinetischen Analysen wurde die intramolekulare Reaktionsgeschwindigkeit in scDNA anhand eines ortsspezifischen Rekombinationssystems untersucht (Parker & Halford, 1991; Oram *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass in diesem System, in welchem zwei entfernt voneinander gebundene Rekombinasen miteinander interagieren, nur bestimmte scDNA-Konformationen einen aktiven Rekombinationskomplex bilden. Die Rekombination erfolgte deshalb über einen sehr weiten Zeitbereich und war nicht durch eine Reaktionskonstante quantitativ beschreibbar (Oram *et al.*, 1997; Sessions *et al.*, 1997).

Die gesamte dreidimensionale Konformation von scDNA-Molekülen kann durch DNA-Krümmung beeinflusst werden. Bei den in Abb. 1.5 und 1.6 gezeigten scDNA Molekülen ist erkennbar, dass der DNA-Strang im Bereich der superhelikalen Endschleifen am stärksten gebogen ist. Deshalb ist eine Endschleifenposition eines durch ein Protein oder aufgrund der Sequenz gekrümmten DNA-Segments energetisch bevorzugt, wofür es eine Reihe experimenteller Belege gibt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von scDNAs, die zwei sequenzinduzierte Krümmungen enthielten, waren häufig verzweigt; dabei entsprach die Distanz der Scheitelpunkte der Verzweigungsäste dem Abstand der Krümmungsinsertionen in der DNA (Laundon & Griffith, 1988). An scDNA sequenzspezifisch gebundenes Tumorsupressorprotein p53, das die DNA verbiegt, wurde auf rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen häufig im Endschleifenbereich gefunden (Jett *et al.*, 2000). Krümmungsinsertionen konnten ebenfalls rasterkraftmikroskopisch direkt lokalisiert werden, indem Verfahren zur sequenzspezifischen Markierung von scDNA entwickelt wurden (Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998): Die Position einer Insertion variierte entsprechend einer Gaussfunktion um einen Endschleifenscheitelpunkt. Diese experimentellen Befunde bestätigen außerdem verschiedene Computermodelle, die eine Endschleifenposition einer lokalen Krümmung vorhersagen (Klenin *et al.*, 1995; Chirico & Langowski, 1996; Sprous & Harvey, 1996; Wedemann *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass dadurch die Gesamtkonformation eines scDNA-Moleküls so organisiert wird, dass zwei symmetrisch zur Krümmung lokalisierte Orte in der DNA sich mit hoher Wahr-

scheinlichkeit in der Superhelix direkt gegenüberliegen (Abb. 1.7). Dies kann nach Modellrechnungen deren Kontaktwahrscheinlichkeit deutlich steigern, selbst wenn die Orte mehrere hundert Basenpaare voneinander entfernt liegen (Klenin *et al.*, 1995). Dagegen sollten Kontakte zwischen nicht-symmetrisch lokalisierten Orten vermindert sein. Nach Simulationen bewirkt in einer 2700 bp großen scDNA eine 120°-Krümmung eine Erhöhung von  $j_M$  um fast eine Größenordnung für symmetrisch angeordnete Orte, die 550 bp voneinander entfernt sind (Klenin *et al.*, 1995). Der Einfluss einer Krümmung ist demnach für große Distanzen wesentlich stärker als in linearer DNA.



**Abb. 1.7** Modell für den Einfluss einer Krümmung in scDNA

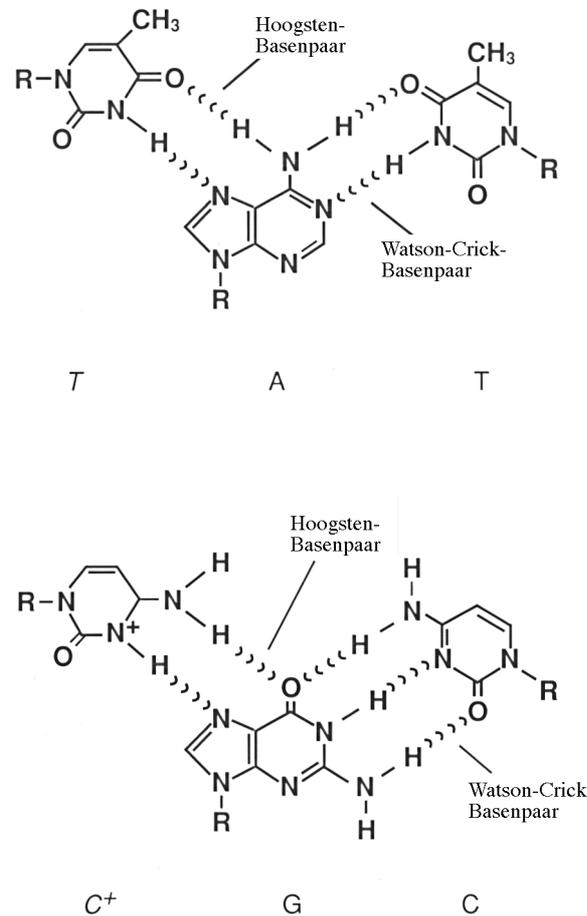
Die Krümmung erzwingt eine bestimmte DNA-Konformation, indem sie bevorzugt in einer Endschleife lokalisiert ist. Die Kontaktwahrscheinlichkeit steigt bei einer symmetrischen Anordnung (A) bzw. sinkt bei einer asymmetrischen Anordnung (B) zweier Orte in Bezug auf die Krümmung.

Ein quantitativer experimenteller Nachweis dieser vermuteten Fernwirkung auf die Interaktionswahrscheinlichkeit liegt jedoch noch nicht vor. Ein indirekter Hinweis ergab sich aus DLS-Messungen, durch die nachgewiesen wurde, dass Krümmungsinsertionen die internen Bewegungen von scDNA vermindern (Kremer *et al.*, 1993; Diekmann & Langowski, 1995). Für die Transkriptionsaktivierung von RNAP• $\sigma^{54}$  durch *Enhancer* wurde der Effekt einer zwischen Promotor und *Enhancer* liegenden sequenzinduzierten Krümmung systematisch untersucht (Schulz, 1999; Schulz *et al.*, 2000): Dabei zeigte sich, dass die Aktivierungsraten nicht mit einer symmetrischen bzw. asymmetrischen Position von Promotor und *Enhancer* in Relation zur Krümmung in Beziehung gesetzt werden konnten. Auch die Anwesenheit oder Abwesenheit der Krümmung hatte keinen deutlichen Einfluss. Hierbei wurde gezeigt, dass die *loop*-Bildung in scDNA für die Aktivierungsrate (in diesem experimentellen Ansatz die Bildung des offenen Polymerase-Promotorkomplexes) nicht geschwindigkeitsbestimmend war. (Schulz *et al.*, 2000). Diese Beobachtung steht auch damit im Zusammenhang, dass die Akti-

vierungsrate von RNAP• $\sigma^{54}$  durch eine IHF-induzierte Krümmung für schwache Promotoren um mehrere Größenordnungen erhöht ist, während für starke Promotoren kein Effekt besteht (Hoover *et al.*, 1990). Um ausschließlich die intramolekulare Kontaktwahrscheinlichkeit entfernt liegender Orte in scDNA quantitativ zu erfassen, ist eine direkte Beobachtung des *looping*-Ereignisses erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von sequenzinduzierter Krümmung auf die irreversible Vernetzungsreaktion zwischen zwei spezifisch biotinylierten Stellen in scDNA über Streptavidin untersucht (siehe Abb. 1.9 unter 1.5). Grundlage hierfür war das bereits etablierte Verfahren zur sequenzspezifischen Markierung von scDNA über triplexbildende Oligonukleotide (Pfannschmidt *et al.*, 1996; Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998).

### 1.3 DNA-Markierung über Triplexbildung

Unter bestimmten Bedingungen bildet einzelsträngige DNA mit doppelsträngiger DNA einen DNA-Triplex aus (Plum *et al.*, 1995). Wie bei der Watson-Crick-Basenpaarung erfolgt die Anlagerung des dritten Strangs sequenzspezifisch über Wasserstoffbrücken, wobei Hoogsteen-Basenpaarungen entstehen (mit “×”, Watson-Crick-Basenpaare mit “•” gekennzeichnet). Zwei Gruppen von Tripelhelizes sind aufgrund der Nukleotidzusammensetzung der triplexbildenden Sequenzen unterscheidbar. Beiden Gruppen ist zunächst gemeinsam, dass der Einzelstrang in der großen Furche einer doppelsträngigen Homopurin•Homopyrimidinsequenz (*pu•py*) bindet. Bei der ersten Gruppe enthält die Einzelstrang-DNA vornehmlich Pyrimidine und bindet parallel zum Purinstrang der Doppelhelix. Es kommen Basenpaarungen der Form T×A•T und C×G•C vor. In der zweiten Gruppe bindet purinreiche Einzelstrang-DNA antiparallel an den Purinstrang der doppelsträngigen DNA. Hierbei können Basenpaarungen der Form G×G•C, A×A•T und T×A•T vorkommen. Abbildung 1.8 zeigt die Basenpaarungen für Triplex-DNA der ersten Gruppe, die für die Markierung von scDNA verwendet wurde (Pfannschmidt *et al.*, 1996; Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998).



**Abb. 1.8** Basenpaarungen in Triplex-DNA der Form  $py \times pu \bullet py$   
Entnommen aus Sinden (1994).

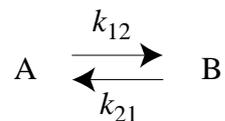
Die Triplexbildung kann zur sequenzspezifischen Markierung verwendet werden, indem  $pu \bullet py$ -Sequenzen in die DNA inkloniert werden, an die triplexbildende Oligonukleotide (TFOs) mit einer zum  $pu$ -Strang komplementären  $py$ -Sequenz anbinden können. Die TFOs sind mit dem gewünschten Marker modifiziert. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass die DNA ohne die Notwendigkeit von Einzelstrangbrüchen markiert werden kann und die native Superhelixdichte der DNA erhalten bleibt.

Aufgrund gelelektrophoretischer Analysen (Lyamichev *et al.*, 1988; Pfannschmidt *et al.*, 1996) und Studien mittels *Photofootprinting* (Lyamichev *et al.*, 1991) ist ein DNA-Triplex zwischen einer einzelsträngigen  $py$ -Sequenz (hier der TFOs) und einer  $pu$ -Sequenz in doppelsträngiger DNA nur in saurem Milieu im Bereich von pH 5.0 stabil. Dies ist der Fall, weil die Cytosine des TFO protoniert sein müssen (siehe Abb. 1.8). Nur bei leicht darüber liegendem pH konnte

Triplex-DNA dieser Form durch Zusatz von  $Mg^{2+}$  oder Spermidin stabilisiert werden (Lyamichiev *et al.*, 1991). Durch eine weitere Modifizierung der TFOs mit Psoralen können diese mit der DNA kovalent verknüpft werden. Psoralen interkaliert neben der *pu•py*-Zielsequenz in die DNA-Doppelhelix und geht dort unter UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 350 nm eine Vernetzungsreaktion vornehmlich mit Pyrimidinen ein (Cimino *et al.*, 1985; Gasparro *et al.*, 1994; Pfanschmidt *et al.*, 1996). So ist das TFO mit der Zielsequenz über einen weiten pH-Bereich stabil verknüpft.

## 1.4 Reaktionskinetiken

Bei einer reversiblen Reaktion ist die Konzentration der Reaktanten zu jedem Zeitpunkt durch die Reaktionskonstante der Hinreaktion  $k_{12}$  und der Rückreaktion  $k_{21}$  bestimmt. Der einfachste Reaktionstyp ist die monomolekulare Umwandlung eines Eduktes A in ein Produkt B:

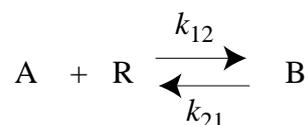


Dieser Typ wird als Reaktion erster Ordnung bezeichnet, weil die Reaktionsgeschwindigkeit nur der zu jedem Zeitpunkt  $t$  vorhandenen Konzentration des Eduktes A proportional ist.  $k$  besitzt deshalb die Einheit  $s^{-1}$ . Es gilt folgendes Geschwindigkeitsgesetz für den zeitlichen Konzentrationsverlauf von A:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{12}[A] + k_{21}[B] \quad (1.5)$$

Die Lösung von Gleichung 1.5 führt zu einer einfachen Exponentialfunktion, die die zeitliche Konzentrationsänderung der Reaktanten beschreibt. Unter 3.3.3 ist dies für einen entsprechenden Fall der vorliegenden Arbeit gezeigt.

Ein weiterer Reaktionstyp ist die bimolekulare Reaktion zweier Stoffe A und R zum Produkt B:



Das Produkt der Konzentrationen beider Stoffe A und R ist dabei geschwindigkeitsbestimmend; es gilt deshalb ein Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{12}[A][R] + k_{21}[B] \quad (1.6)$$

Die Reaktionskonstante  $k_{12}$  besitzt hier die Einheit  $M^{-1} \cdot s^{-1}$ . Die Lösung dieser Gleichung zur Berechnung der Konstante aus dem experimentell bestimmten Konzentrationsverlauf der Reaktionspartner ist im Vergleich zum Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung sehr komplex. Der Zeitverlauf vereinfacht sich, wenn ein Reaktant (z. B. das Edukt R) in einem großen molaren Überschuss zugegeben wird. Dessen Konzentration ist dann näherungsweise zeitlich konstant und die Reaktionsgeschwindigkeit hängt scheinbar nur von der Konzentration des Reaktionspartners A ab. Die Konstante  $k_{12}$  wird mit [R] zur apparenten Reaktionskonstanten  $k_{app12}$  zusammengefasst und es resultiert entsprechend Gleichung 1.5 ein Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{app12}[A] + k_{21}[B], \quad (1.7)$$

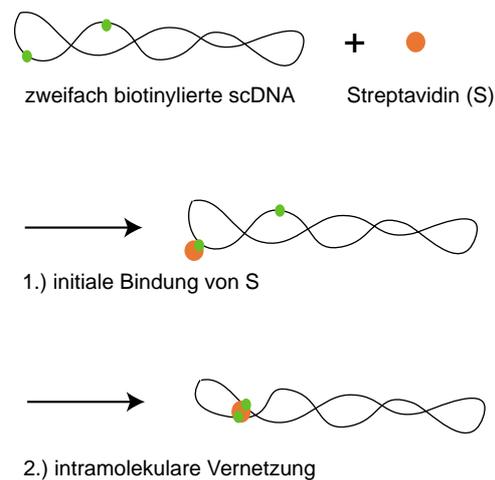
wobei

$$k_{app12} = k_{12} \cdot [R]. \quad (1.8)$$

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Viele zelluläre Prozesse erfordern Wechselwirkungen zwischen entfernt liegenden Orten auf der DNA, die durch DNA-Schleifenbildung in Kontakt zueinander treten. Die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit ist durch verschiedene strukturelle Merkmale der DNA bestimmt, wie etwa Krümmung und Superhelizität, und ist deswegen Thema zahlreicher experimenteller und theoretischer Untersuchungen. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit basiert auf Erkenntnissen, nach denen eine lokale Krümmung in superhelikaler (sc) DNA bevorzugt in Endschleifen lokalisiert ist (Laundon & Griffith, 1988; Pfannschmidt & Langowski, 1998). Diese Endschleifenposition sollte die dreidimensionale Konformation von scDNA-Molekülen bestimmen. Nach theoretischen Analysen beeinflusst eine Krümmung deshalb die Wechsel-

wirkungswahrscheinlichkeit von Orten, auch wenn diese mehrere hundert Basenpaare von der Krümmung entfernt liegen (Klenin *et al.*, 1995). Diese vorhergesagte Fernwirkung sollte quantitativ durch kinetische Messungen der Vernetzungsreaktion zweier biotinylierter Stellen über Streptavidin in superhelikaler Plasmid-DNA charakterisiert werden (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9** Reaktionsschema der intramolekularen Vernetzung über Streptavidin.

Speziell waren dazu folgende Fragen zu beantworten:

1. In welchem Maße erhöht eine zentral zwischen den Biotinylierungsstellen liegende Krümmung die Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion gegenüber einer Kontrolle ohne Krümmung?
2. Wie ändert sich die Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion bei einer in Relation zur Krümmung asymmetrischen Biotinanordnung im Vergleich zu einer symmetrischen Anordnung?
3. Welchen Einfluss haben verschiedene krümmungsinduzierende Sequenztypen?
4. Lassen sich numerische Simulationen mit den Ergebnissen aufgrund der Vernetzungsreaktion vereinbaren?

Es standen Plasmide zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung, die verschieden stark gekrümmte Insertionen enthielten, und die an einer Stelle über triplexbildende Oligonukleotide sequenzspezifisch biotinyliert werden konnten (Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998). Um die genannten Fragen zu beantworten, musste daraus zunächst ein Satz von Plasmiden hergestellt werden, die zweifach über TFOs an bestimmten Positionen markiert werden konnten. Es musste dann ein Protokoll zu einer quantitativen Auswertung der

Vernetzungsreaktion ausgearbeitet werden. Dies erforderte eine genaue Charakterisierung des Reaktionssystems. Zur Beobachtung von schnellen Kinetiken wurde ein Quench-Flow-Instrument verwendet, das ebenfalls zu charakterisieren war. Eine genaue Eichung des Reaktionssystems sollte die Bestimmung von Maßzahlen für die Interaktionswahrscheinlichkeit, d. h. der lokalen Konzentrationen  $j_M$  und der intramolekularen Reaktionskonstanten, ermöglichen. Für einen unmittelbaren Vergleich mit Computersimulationen war dies unerlässlich. Konstantin Klenin führte für die hergestellten Plasmide Simulationen mit dem Programm *Corchy* (Klenin *et al.*, 1995) zur Berechnung von  $j_M$  durch.



# 2. Material und Methoden

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien, biochemische Produkte und Laborgeräte

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), DIFCO Laboratories (Detroit, USA), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Arcos Organics (New Jersey, USA), BMA (Rockland, USA), Pharmacia (Freiburg, Deutschland), Dupont (Bad Homburg, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) und Pierce (Rockford, USA).

Die eingesetzten Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Ligase u. a.) und DNA-Molekulargewichtsmarker stammten von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) und AGS-GmbH (Heidelberg, Deutschland).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden der Plasmid Mini Kit und der Plasmid Maxi Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) benutzt.

Sequenzierungen wurden mit dem *T7*-Sequenase Kit von Amersham (Cleveland, USA) durchgeführt. Das dabei eingesetzte <sup>35</sup>S-ATP wurde von der Firma Hartmann (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Homopyrimidin- bzw. Homopurinoligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt.

Es wurden die folgenden Mess- und Laborgeräte verwendet:

- |   |  |
|---|--|
| • Ultraspec 3000 Spektrometer             | Pharmacia, Freiburg, Deutschland             |
| • Cary-4E Spektrometer                    | Varian, Mulgrave, Australia                  |
| • SLM-Aminco 8100 Fluoreszenzspektrometer | SLM, Urbana, IL                              |
| • Quench-Flow-Modul (QFM-5)               | Claix, Frankreich                            |
| • Stopped-Flow-Modul (SFM-3)              | Claix, Frankreich                            |
| • Nanoscope III Rasterkraftmikroskop      | Digital Instruments Inc., Santa Barbara, USA |
| • Silizium-Spitzen                        | L.O.T. Oriel, Darmstadt, Deutschland         |

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| • Crystal HPLC-Gerät                  | Unicam, Kassel, Deutschland                           |
| • Tischzentrifugen 5417 C/R u. 5415 C | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                       |
| • Sorvall RC-5B plus Zentrifuge       | DuPont, Wilmington, USA                               |
| • Biostat B Fermenter                 | B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen, Deutschland |
| • Spannungsgeber E400                 | Consort, Turnhout, Belgien                            |
| • Waage, Typ PM480                    | Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz                |

## 2. 1. 2 Streptavidin-Peroxidase

Zur Untersuchung von intramolekularen Reaktionen in biotinylierter scDNA wurde Streptavidin-Peroxidase (Strept-POD) der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Dies ist ein Konjugat aus 2 mol Peroxidase (*Horseradish-Peroxidase*) pro 1 mol Streptavidin. Es besitzt eine Größe von etwa 140 kD, womit es auf SFM-Bildern deutlich erkennbar ist (siehe Abb. 3.9 und 3.10 unter 3.2.2). Das als Lyophilisat erhaltene Protein wurde bei einer Konzentration von 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O gelöst, aliquotiert und dann in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Nach Angaben des Herstellers befindet sich das Protein bei dem entsprechenden Lösungsvolumen in 150 mM NaCl, 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 6.8.

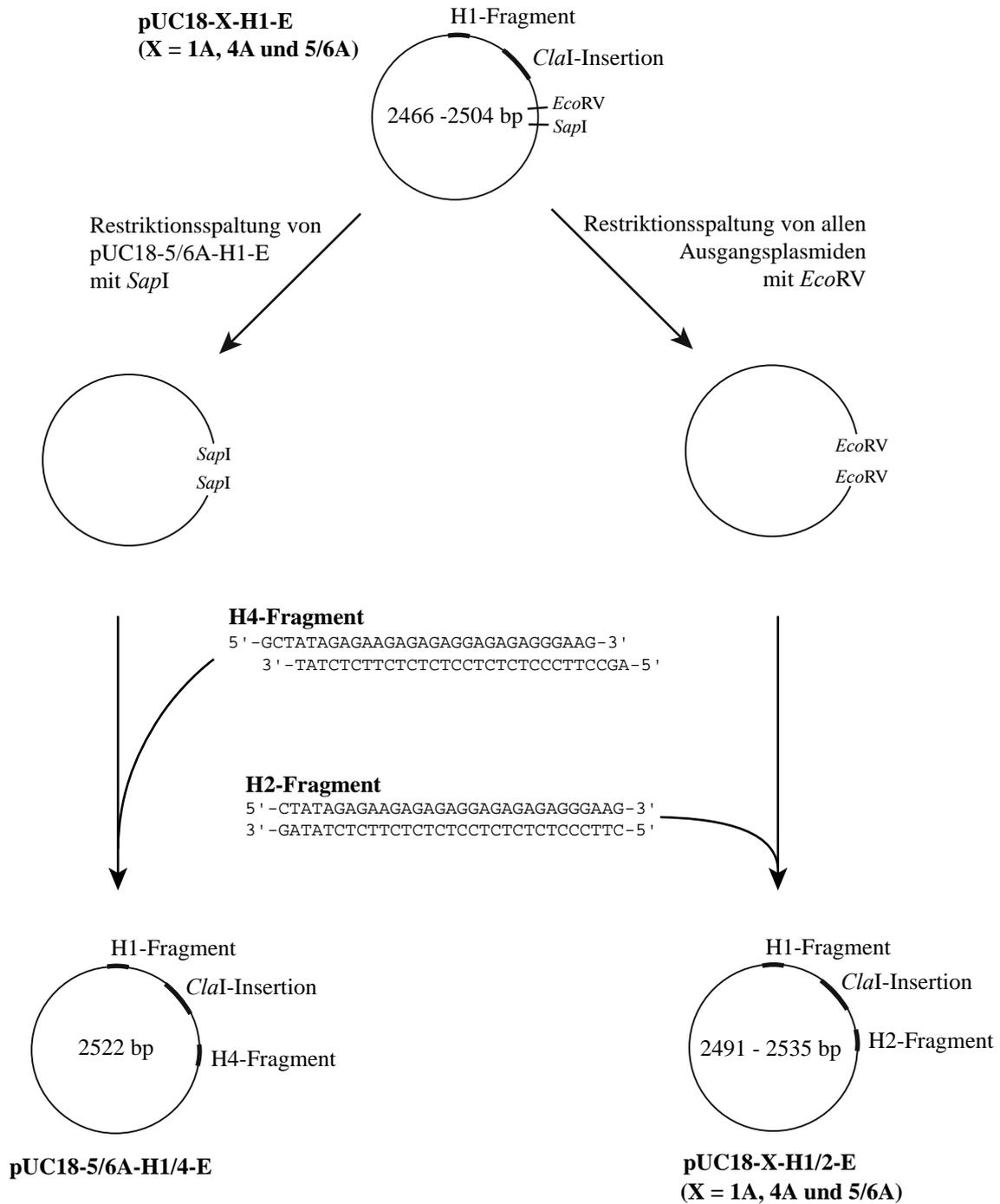
## 2. 1. 3 Die untersuchte Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial für die hier untersuchte DNA dienten die Plasmide pUC18-1A-H1-E, pUC18-4A-H1-E und pUC18-5/6A-H1-E, die aus einer vorhergehenden Studie für diese Arbeit zur Verfügung standen (Pfannschmidt & Langowski, 1998). Die Bezeichnungen 1A, 4A und 5/6A beziehen sich auf Insertionen in der *Cla*I-Restriktionsstelle (Kremer, 1992), wobei die Insertionen 4A und 5/6A eine sequenzinduzierte Krümmung aufweisen, während die Insertion 1A ungekrümmt ist. Die permanente Verbiegung beruht, wie unter 1.2.2 beschrieben, auf repetitiven Adeninblöcken (A-Blöcke), die sich in Phase mit der helikalen Windung der DNA-Doppelhelix befinden. Die Sequenzen dieser Insertionen, die zu Beginn der Untersuchungen verifiziert wurden, sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Die Sequenz 4A weist insgesamt acht sich wiederholende A<sub>4</sub>-Blöcke und die Sequenz 5/6A sechs alternierende A<sub>5</sub>- und A<sub>6</sub>-Blöcke auf. Diese Plasmide werden im Folgenden als A<sub>4</sub>-Typ und als A<sub>5-6</sub>-Typ angesprochen. Die Bezeichnung H1 weist auf eine 31bp umfassende Insertion zwischen den Restriktionsstellen *Aat*II und *Nar*I hin, die eine 27bp Homopurin•Homopyrimidinsequenz (*pu•py*) enthält. Diese Insertion ist die Erkennungsstelle für das DNA-triplexbildende Oligonukleotid

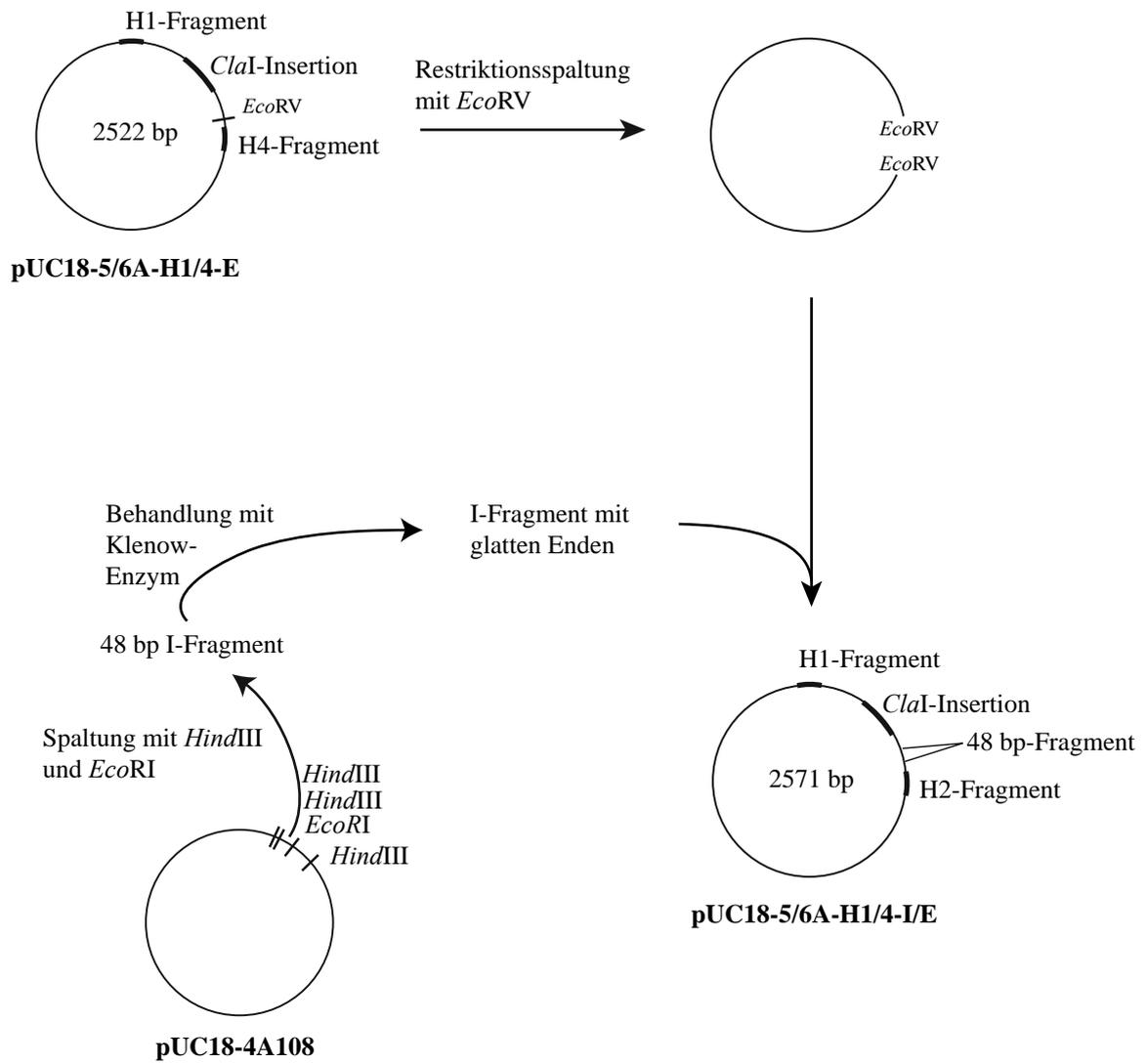
TFO3, über welches die DNA sequenzspezifisch markiert werden kann ( 2.3.5.). Weiterhin ist die Deletion eines durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen *PstI* und *ClaI* gebildeten Fragments durch die Bezeichnung E angegeben.

Durch weitere Subklonierungen wurde eine zweite *pu•py*-Sequenz in die Plasmide eingebracht. Die oben genannten Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert, das in diesen pUC18-Derivaten eine Einzelschnittstelle erkennt. Das einzuklonierende doppelsträngige *pu•py*-Fragment H2 wurde zunächst durch die Hybridisierung der entsprechenden komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide GA-H2 und CT-H2 gebildet und dann mit der Vektor-DNA ligiert. Aus diesen Klonierungen entstanden die Plasmide pUC18-1A-H1/2-E, pUC18-4A-H1/2-E und pUC18-5/6A-H1/2-E. Um weitere Markierungspositionen in DNA des A<sub>5-6</sub>-Typs zu erhalten, wurde zunächst in pUC18-5/6A-H1-E das *pu•py*-Fragment H4 in die Einzelschnittstelle des Enzyms *SapI* eingefügt. Die Sequenzen der das H4-Fragment bildenden einzelsträngigen Oligonukleotide GA-H4 und CT-H4 wurden so gewählt, dass nach ihrer Hybridisierung zu den durch *SapI* erzeugten 5'-überhängenden Enden komplementäre Enden vorhanden waren und mit der durch *SapI* linearisierten DNA ligiert werden konnten. Das Ergebnis dieser Klonierung war pUC18-5/6A-H1/4-E. In dieses Plasmid wurde weiterhin ein 48 bp-Fragment (I-Fragment) in die Einzelschnittstelle des Enzyms *EcoRV* eingefügt. Dieses Fragment wurde von Frau Nathalie Brun zur Verfügung gestellt. Es wurde durch Schneiden von pUC18-4A108 (Kremer, 1992) mit *HindIII* und *EcoRI* erhalten und aus dem Gel aufgereinigt. Die 5'-überhängenden Enden des Fragments wurden durch Behandlung mit Klenow-Enzym aufgefüllt, so dass die Vektor-DNA und das Fragment ligierbare glatte Enden besaßen. Nach Einfügen dieses Fragments entstand das Plasmid pUC18-5/6A-H1/4-I/E. Die vorgenommenen Klonierungen sind in Abb. 2.1. und Abb. 2.2. schematisch dargestellt.

Die Klonierungen der Plasmide wurden durch Sequenzierungen überprüft. Dadurch wurde außerdem die Orientierung der Fragmente in den Plasmiden festgestellt, die aufgrund der Klonierung in Einzelschnittstellen nicht von vornherein festgelegt war. Bei der Klonierung des Fragments H2, die in allen Ausgangsplasmiden vorgenommen wurde, sind diejenigen Stämme zur weiteren Bearbeitung ausgewählt worden, in denen das Fragment jeweils in gleicher Orientierung vorlag.



**Abb. 2.1** Klonierungsschema I  
Entstehung der Plasmide pUC18-5/6A-H1/4-E und pUC18-XA-H1/2-E (X = 1A, 4A und 5/6A).



**Abb. 2.2** Klonierungsschema II  
 Entstehung des Plasmids pUC18-5/6A-H1/4-I/E.

Tab. 2.1 Sequenzen der *Cla*I-Insertionen

Plasmid	Sequenz 5'- <i>Cla</i> I-Insertion- <i>Cla</i> I-3'	Länge (bp)	Eigenschaft
pUC18-1A-H1/2-E	atcGAGGTCCTGTCGACAGGACTCGACA GGACTCGACAGGACTCGACAGGACTCG ACAGGACTCGACAGGACCTGACAGGA CTCGACAGGACTCgat	92	ungekrümmt
pUC18-4A-H1/2-E	atcGACAAAACCTCGACAAAACCTCGACAA AACTCGACAAAACCTCGACAAAACCTCGA CAAAAACCTCGACAAAACCTCGACAAAACCT Cgat	80	gekrümmt
pUC18-5/6A-H1/2-E	atcGTCTCTAAAAAATATATAAAAAATCT	67	gekrümmt
pUC18-5/6A-H1/4-E	CTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAA		
pUC18-5/6A-H1/4-I/E	AATATATAAAAAATCCgat		

## 2.2 Mikrobiologische Verfahren

### 2.2.1 Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurden NovaBlue-Zellen (*Escherichia coli*) verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine *recA*-Mutation aus, wodurch die homologe Rekombination der DNA verhindert ist und damit die Bildung von Konkateren unterdrückt wird.

NovaBlue: endA1 hsdR17( $r_{K12}^-m_{K12}^+$ ) supE44 thi-1 *recA1* *gyrA96* *relA1* lac [f' *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lac*<sup>q</sup>ZDM15::TN10]

Um Plasmid-DNA in großen Mengen gewinnen zu können, muss diese zunächst in Bakterienzellen eingeschleust werden. Dann kann das Plasmid repliziert werden (Transformation, s. Abschn. 2.2.3.). Dazu werden kompetente Zellen benötigt, die eine für DNA permeable Zellwand aufweisen. Es konnten hier kompetente Zellen verwendet werden, die bereits von Frau Claudia Pfannschmidt aus NovaBlue-Zellen hergestellt und als Glycerinkulturen bei -80°C eingelagert wurden (Pfannschmidt, 1998).

## 2. 2. 2 Nährmedien und Glycerinkulturen

### Nährmedien

- Die Anzucht der Bakterienzellen fand in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) statt: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, mit 1 M NaOH auf pH 7.5 einstellen. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 1.5% (w/v) Agar zugesetzt.
- Zur Anzucht im 10 l- Fermenter wurde Minimalmedium (M9-Medium) verwendet: 12 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/l NaCl, 1.0 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mit 0.4 % (w/v) Glucose, 0.4 % (w/v) Casein und 0.02 mg/ml Thiaminchlorid. Letzteres wird in 1 mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  gelöst.
- Transformationen fanden in SOC-Medium statt, das man wie folgt erhält: 1.) Zunächst SOB-Medium herstellen: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.5. Vor Gebrauch des Mediums außerdem Zugabe von 5 ml einer sterilen Lösung von 2 M  $\text{MgCl}_2$ . 2.) SOB-Medium autoklavieren und 20 mM sterilfiltrierte Glucose zugeben, sobald die Lösung auf unter 60 °C abgekühlt ist.

Alle Medien wurden für 45 min bei 121 °C und 1.2 bar autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Substanzen Glucose, Casein und Thiamindichlorid wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert. Da die zu vermehrende Plasmid-DNA ein Ampizillinresistenzgen trägt, wurden Selektivmedien durch den Zusatz von 75 µg/ml Ampizillin zum LB- bzw. M9-Medium kurz vor dem Beimpfen hergestellt. Für Selektivagarplatten wurden 100 µg/ml Ampizillin vor dem Gießen zugegeben. Eine 200 mg/ml Ampizillin-Stammlösung wurde sterilfiltriert und bei -80°C gelagert.

### Glycerinkulturen

Klonierte Bakterienstämme wurden als Glycerinkulturen aufbewahrt: In 2 ml-Kryoröhrchen wurden 850 µl einer Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerin (15% (v/v)) vermischt. Das Gemisch wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in -80 °C eingelagert. Die Bakterien sind nach dieser Behandlung praktisch für unbegrenzte Zeit haltbar. Zur Vermehrung der Bakterien kann z. B. LB-Medium direkt mit einer kleinen Menge einer Glycerinkultur beimpft werden.

### 2. 2. 3 Transformation

Die Transformation diente zum Einschleusen von neu konstruierten Plasmiden in Bakterienzellen. Diese replizieren das Plasmid, sofern der Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird. Kompetente Bakterienzellen wurden mit der in einem Ligationsansatz (2.3.2) vorhandenen Plasmid-DNA transformiert; die Transformanten wurden daraufhin kloniert, um diejenigen Bakterienstämme zu ermitteln, die das gewünschte veränderte Plasmid enthielten.

50 µl der eingefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach 10 min mit ca. 1 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis gehalten und dann für 90 s auf 42 °C erhitzt. Diese Temperaturerhöhung fördert die Aufnahme der Fremd-DNA. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 750 µl SOC-Medium zugegeben und das Gemisch wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit findet die Reparatur der Zellwand und die Expression der Antibiotikaresistenzproteine statt. Zur Klonierung der Transformanten wurden 30-100 µl der Zellsuspension auf Selektivagarplatten ausgestrichen, die ü. N. bei 37 °C inkubiert wurden.

### 2. 2. 4 Plasmidfermentation

Die Plasmidfermentation diente zur Vermehrung der Bakterien, die mit einem zu präparierenden Plasmid transformiert wurden. 10 ml LB-Medium mit zugegebenem Ampizillin wurden mit einem Klon einer Selektivagarplatte oder mit einer kleinen Menge einer Glycerinkultur angeimpft und für 8-10 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wuchsen in dieser Zeit bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 1$ .

Zur Analyse von Transformanten wurde die Plasmid-DNA aus 10 ml-Kulturen präpariert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 8 min bei 5000 x g geerntet.

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu gewinnen, wurden 500 ml LB-Medium mit einer bis  $OD_{600} \sim 1$  gewachsenen 10 ml-Kultur, die hierbei als Vorkultur diente, beimpft und ü. N. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert.

Bakterien wurden außerdem in einem 10 l-Fermenter kultiviert. Dazu wurden zwei 50 ml-Vorkulturen in LB-Medium ü. N. angezüchtet. Die in dieser Zeit gewachsenen Bakterien wurden bei 6000 x g für 15 min abzentrifugiert, erneut in LB-Medium aufgenommen und zum M9-Medium im 10 l-Fermenter gegeben. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 1.5$  (Wachs-

tum unter Belüftung, Rühren und pH-Kontrolle) wurden 170 mg/ml Chloramphenicol zugegeben. Dieses Antibiotikum hemmt als kompetitiver Inhibitor der Peptidyltransferase die Proteinbiosynthese der Bakterien. Da die Replikation des Bakterienchromosoms von der Proteinsynthese abhängig ist, wird das Bakterienwachstum gestoppt, während die Plasmid-DNA aber weiter repliziert wird und sich in den Zellen anreichert (Amplifikation). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6000 x g für 15 min geerntet.

## 2.3 Biochemische und molekularbiologische Verfahren

### 2.3.1 Plasmid-Präparation

#### Minipräparation

Mit der Plasmid-Minipräparation wurde die Plasmid-DNA aus einer 10 ml-Kultur zur Analyse der Subklonierungen aufgereinigt. Dazu wurde die QIAprep-Methode der Firma QIAGEN verwendet, durch die sich Plasmid-DNA mit für Restriktionsanalysen oder Sequenzierungen ausreichend hoher Ausbeute und Reinheit isolieren lässt.

Bei dieser Methode werden die aus dem Wachstumsmedium abzentrifugierten Zellen nach Resuspension in einem NaOH/SDS-Puffer in Anwesenheit von RNase A lysiert, wobei Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturieren. Das Lysat wird dann neutralisiert und auf Hochsalzbedingungen eingestellt. Proteine, chromosomale DNA, Zellwandbestandteile und SDS präzipitieren und lassen sich abzentrifugieren. Die Plasmid-DNA renaturiert und verbleibt im Überstand, der auf eine den QIAprep-Filter enthaltende Säule geladen wird. Unter der Wirkung chaotroper Salze und eines  $\text{pH} < 7.5$  adsorbiert die DNA an die Kieselgelmatrix des QIAprep-Filters während kurzer Zentrifugation. Die Elution der DNA aus dem Filter erfolgt durch Zentrifugation unter Niedrigsalzbedingungen, wobei als Elutionspuffer 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 verwendet wurde.

Die Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### Maxipräparation

Mittels Maxipräparation wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien einer 500 ml-Kultur oder einer 10 l-Fermentation isoliert. Dazu wurde das QIAfilter Maxi Kit der Firma QIAGEN benutzt.

Die Lyse der Zellen erfolgt entsprechend der oben beschriebenen Methode. Man erhält ebenfalls nach Zentrifugation einen die Plasmid-DNA enthaltenden Überstand, der auf eine Säule gegeben wird. Die Bindung an den QIAGEN-Filter erfolgt hier jedoch mittels eines Anionenaustauschmaterials unter Niedrigsalzbedingungen und geeignetem pH. Der Filter wird dann bei mittlerer Salzkonzentration gewaschen, wobei Rückstände wie Proteine oder RNA entfernt werden. Die DNA wird unter Hochsalzbedingungen eluiert; zur Umpufferung und Konzentrierung erfolgt eine Isopropanolfällung.

Es wurden pro QIAGEN-Säule 500 ml Bakterienkultur eingesetzt; zur Aufreinigung wurde das vom Hersteller angegebene Protokoll verwendet. Die nach der Isopropanolfällung abzentrifugierte DNA wurde in 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 aufgenommen.

### **HPLC-Aufreinigung**

Für die durchzuführenden Messungen war es entscheidend, superhelikale DNA in größtmöglicher Reinheit zu gewinnen. Durch die HPLC-Reinigungsmethode nach Kapp & Langowski (1992) können superhelikale Moleküle von den nach der Maxipräparation ebenfalls vorhandenen linearen und ringoffenen Molekülen mit hoher Effizienz getrennt werden. Es werden auch Moleküle mit niedriger superhelikaler Dichte von solchen mit hoher superhelikaler Dichte getrennt.

Eine *Reverse-Phase*-Säule (RP-18) der Firma Merck wurde zunächst mit Puffer A (0.2 M  $\text{NH}_4$ -acetat, pH 6.6, 10 % DMSO, 0.1 mM EDTA) äquilibriert und mit der Plasmid-DNA beladen. Dann wurde in einem Gradienten über 100 min 0-40 % Puffer B (40 % (v/v) Acetonitril, 10 % (v/v) DMSO, 0.1 mM EDTA) zugegeben, währenddessen Fraktionen über je 2 min gesammelt wurden. Die die superhelikale DNA enthaltenden Fraktionen wurden durch die Analyse auf einem 1%igen Agarosegel detektiert und durch Zugabe von 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde dann abzentrifugiert und in 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 aufgenommen.

## **2. 3. 2 Enzymatische Modifikationen der DNA**

### **Restriktionsspaltungen**

Restriktionsspaltungen zur qualitativen oder quantitativen Analyse der Plasmid-DNA auf Agarosegelen, nativen Polyacrylamidgelen oder im Rasterkraftmikroskop wurden in 20  $\mu\text{l}$ -Ansätzen mit 0.6-1.2 pmol DNA und 1-2 U Restriktionsenzym durchgeführt. Die Puffer- und

Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 1-2 h.

Präparative Restriktionsspaltungen zur Erzeugung von Vektoren fanden in 80 µl-Ansätzen mit 12 pmol DNA und 10 U Enzym statt. Diese Restriktionsansätze wurden ü. N. inkubiert.

### **Dephosphorylierung**

Da die Einklonierung der *pu•py*-Fragmente H1 und H4 sowie des I-Fragments in Einzelschnittstellen (der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *SapI*) vorgenommen wurde (vgl. Klonierungsschemata in Abb. 2.1 und 2.2), bestand die Möglichkeit, dass die Vektor-DNA bei der Ligationsreaktion ohne Einbau des Fragments zirkularisiert wurde. Um dies zu unterdrücken, wurden nach der Restriktionsspaltung die 5'-Phosphatreste an den Enden der Vektor-DNA durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (0.5 U/pmol DNA-Enden für 30 min bei 37 °C) entfernt. Die DNA wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Ethanol-fällung nach Sambrook *et al.* (1989) von der Phosphatase und dem Restriktionsenzym getrennt.

### **Auffüllen von 3'-rezessiven Enden mit Klenow-Enzym**

Mit dem Klenow-Enzym können 3'-rezessive DNA-Enden in glatte Enden überführt werden, so dass diese mit einer Vektor-DNA, die ebenfalls glatte Enden aufweist, ligiert werden können. Dieses Enzym ist das große Fragment der DNA-Polymerase I, welches nach Subtilisin-spaltung des Holoenzym entsteht. Es besitzt wie DNA-Polymerase I die 5'→3'-Polymeraseaktivität und die 3'→5'-Exonukleaseaktivität, jedoch, im Gegensatz zum Holoenzym, keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Somit können Mononukleotide an 3'-OHs durch die Polymeraseaktivität angefügt und 3'-rezessive Enden aufgefüllt werden. Ein 40 µl Reaktionsansatz enthielt 30 pmol DNA (I-Fragment, siehe 2.1.3), je 5 mM dNTPs und 10 U Klenow-Enzym in Ligationspuffer (siehe Ligation).

### **Ligation**

Zur Ligation der Vektor-DNA mit den einzuklonierenden Fragmenten wurde die *T4*-DNA-Ligase verwendet, die freie 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent verbindet. Mit dieser Ligase können sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpft werden.

Die Ligationen fanden in einem Volumen von 15 µl bei 16 °C ü. N. statt. Ein Ansatz für die Ligation von kohäsiven Enden enthielt 0.3 pmol Vektor-DNA, 0.4 U *T4*-DNA-Ligase, 3 pmol doppelsträngiges DNA-Fragment, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und 1 mM ATP in 66 mM Tris/HCl (pH 7.9). Um hybridisierte Enden zu trennen, wurde der Ansatz vor Zugabe der Ligase 5 min auf 45 °C erwärmt.

Zur Ligation von glatten Enden wurde dem Ansatz 5% PEG 6000 beigelegt; die Ligase wurde in 10 facher Konzentration (4 U) eingesetzt.

Vor der Ligation wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide, welche die Fragmente H2 bzw. H4 bilden (vgl. Abb. 2.1), in 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 zu Duplex-DNA hybridisiert. Ein 100 µl-Hybridisierungsansatz mit je 1 µM beider Oligonukleotide wurde für 10 min auf 70 °C erhitzt und daraufhin über einen Zeitraum von ~ 50 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 2. 3. 3 DNA-Sequenzierreaktion

Mittels DNA-Sequenzierungen nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) wurden die *Cla*I-Insertionen überprüft, die in den Plasmiden des Typs A<sub>4</sub> und A<sub>5-6</sub> die intrinsische Krümmung hervorrufen. Außerdem wurden die inklonierten Fragmente H2 und H4 sowie das I-Fragment in den Plasmiden nachgewiesen. Mit dem benutzten Sequenzierkit wird die Sequenzierung direkt am Plasmid vorgenommen. Es wurde der in dem Kit mitgelieferte -40 forward-Primer verwendet; zur autoradiographischen Detektion der Sequenzierungen wurde <sup>35</sup>S-ATP eingesetzt.

Die DNA wird zunächst in einem Glycol enthaltenden oder in einem alkalischen Denaturierungsreagenz zu einzelsträngiger DNA denaturiert (hier wurde Glycol verwendet). Der Primer bindet an die einzige komplementäre Stelle der einzelsträngigen DNA. Für die nachfolgende Markierungsreaktion werden die vier Nukleotide (dNTPs), <sup>35</sup>S-ATP und das Sequenaseenzym, das die Synthese eines zur Matrizen-DNA komplementären Strangs vom Primer aus in 3'-Richtung katalysiert, zugegeben. Dieser Reaktionsansatz ist so gewählt, dass der Primer um einige Nukleotide verlängert wird, wobei auch das <sup>35</sup>S-ATP eingebaut wird. Die darauf folgende Sequenzier- oder Abbruchreaktion findet in vier Reaktionsansätzen statt (für jeweils G, T, A und C), in denen ein Teil eines der Nukleotide als Didesoxyribonukleotid (ddNTP) vorliegt (z. B. ddGTP im Ansatz für G). Die Sequenase verlängert den zur Matrize komplementären Strang unter Einbau sowohl von dNTPs als auch von ddNTPs. Wird dem sich

verlängernden Strang zufällig ein ddNTP angefügt, kann wegen des fehlenden 3'-OH die Synthese nicht weiter fortschreiten, d. h. die Kettenverlängerung bricht an dieser Position ab. Die Längen der auf diese Weise entstandenen DNA-Stränge entsprechen somit den einzelnen Basenpositionen. Die vier Sequenzierungsansätze werden nebeneinander auf ein Sequenziergel (2.3.4) geladen, nach dessen autoradiographischer Detektion die DNA-Sequenz anhand des Bandenmusters abgelesen werden kann.

Zur Sequenzierung wurde außerdem ein automatisches Sequenziergerät mit Fluoreszenzdetektion (ABI, Modell 373 A) verwendet. Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) benutzt. In jedem Sequenzierungsansatz ist ein Teil der ddNTPs mit einem für jede Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Das Sequenziergerät detektiert im Sequenziergel die aufeinander folgenden Fluoreszenzemissionssignale, deren Abfolge die Basensequenz ergibt. Diese Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Herrn Andreas Hunziker im Deutschen Krebsforschungszentrum durchgeführt.

## 2. 3. 4 Elektrophoresen

### Agarose- und native Polyacrylamidgele

Es wurden 1.0 %ige Agarosegele (w/v) in 1 x TAE Puffer (40 mM Tris, pH 8.0, 5.71 % Eisessig (v/v), 2.0 mM EDTA) verwendet. Die Feldstärke bei der Elektrophorese betrug 7-9 V/cm. Die Proben-DNA in einem Volumen von 5 µl wurde mit 5 µl 5 x Ladepuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.0, 150 mM EDTA, 0.05 % Bromphenolblau (w/v), 25 % Glycerin) vermischt und in eine Geltasche geladen.

Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE) fanden in 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.0 mM EDTA, pH 8.0) statt. Es wurden 6 oder 8 %ige Polyacrylamidgele benutzt; zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 6 -7 V/cm Gel angelegt. Eine 40 ml Gellösung wurde wie folgt hergestellt:

- 8 ml (für 6 %ig) bzw. 10.6 ml (für 8 %ig) 30 % Acrylamid/Bisacrylamid
- 4 ml 10 x TBE
- 1 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat (APS)

Kurz bevor das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde, wurde der Gellösung 40  $\mu$ l TEMED zugesetzt, das unter der Zusammenwirkung mit APS die Polymerisation des Acrylamids auslöst.

Das Migrationsverhalten der DNA im Gel ist durch die Länge und den Grad der Quervernetzung der Acrylamidketten bestimmt. Die Länge kann durch die Acrylamidkonzentration, der Vernetzungsgrad durch den Anteil des Bisacrylamids eingestellt werden. Das Acrylamid/Bisacrylamidverhältnis war 60:1 in den 6 %igen und 37.5:1 in den 8 %igen Gelen. Vor dem Beladen des Gels wurden 0.5-1.0  $\mu$ g DNA in 10-12  $\mu$ l mit 8  $\mu$ l 5 x Ladepuffer (s.o.) vermischt.

Zur Detektion der Gelbanden (bei Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophoresen) wurden Agarosegele für 8 min und Polyacrylamidgele für 5 min in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Ethidium interkaliert in die DNA und konzentriert sich infolgedessen dort, wo sich die DNA-Banden befinden. Auf einem UV-Leuchttisch können die DNA-Banden dann anhand des fluoreszierenden Ethidiums detektiert werden.

### **Chloroquingel**

Die Verbindungsdifferenz  $\Delta Lk$  und damit die Superhelixdichte  $\sigma$  der untersuchten DNA wurde nach der *Band-counting*-Methode (Keller, 1975) bestimmt. Das Prinzip beruht darauf, dass Topoisomere mit zunehmender Superhelixdichte schneller im Agarosegel wandern und deshalb als einzelne Banden unterschieden werden können. Allerdings trifft dies in einem normalen Agarosegel nur für Topoisomere mit geringer Verbindungsdifferenz zu. Durch den Zusatz von Chloroquin in das Gel können Topoisomere mit höheren Verbindungsdifferenzen aufgetrennt werden, wie sie für native superhelikale DNA typisch sind. Chloroquin interkaliert in die DNA und entwindet dabei die DNA-Doppelhelix, wodurch die Superhelixdichte um einem zur Chloroquinmenge proportionalen Betrag herabgesetzt wird. Die Verbindungszahl  $\Delta Lk$  ändert sich dabei nicht. So können, je nach der Chloroquinmenge, prinzipiell alle Topoisomere im Gel aufgetrennt werden. Im Vergleich zu Topoisomeren mit bekanntem  $\Delta Lk$ , die als Standard auf das Gel mit aufgetragen werden, können die Banden der Proben-DNA entsprechenden  $\Delta Lk$ -Werten zugeordnet werden.

Hier wurden 1 %ige Agarosegele unter Zusatz von 0.5 oder 1.0  $\mu$ g/ml Chloroquin in das Gel und in den Elektrophoresepuffer hergestellt. Es wurde ein pUC18-Topoisomerstandard ver-

wendet, der von Frau Nathalie Brun zur Verfügung gestellt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 2.5 h.

### Sequenziergel

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden in einem denaturierenden 80 cm-Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Wie oben erwähnt, wurde die Plasmid-DNA für die Sequenzierreaktion in einem glycolhaltigen Puffer denaturiert. Da Glycol bei der Elektrophorese in TBE-Puffer Verzerrungen im Gel verursachen kann, muss anstelle von TBE-Puffer ein glycoltoleranter Puffer verwendet werden, in dem Borat durch Taurin ersetzt ist (216 g/l Tris/HCl, 72 g/l Taurin, 4 g/l Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0).

In 100 ml einer 8 %igen Gellösung (20 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 5 ml 20 x glycoltoleranter Puffer) wurden 7 M Harnstoff (48 g) gelöst. Vor dem Gießen des Gels wurden 200 µl 40 % APS (w/v) und 35 µl TEMED zugegeben. Eine der Glasplatten, zwischen die die Gellösung gefüllt wurde, wurde mit Repel Silane behandelt, um das Ablösen des Gels von der Glasplatte nach der Elektrophorese zu erleichtern.

Da einzelsträngige DNA im Gel aufgetrennt werden sollte, wurde das auspolymerisierte Gel bei 20 mA für 40 min auf 50 °C vorgewärmt, um beim Beladen des Gels eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Die Proben-DNA wurde, kurz bevor sie auf das Gel aufgetragen wurde, in einem denaturierenden Ladepuffer (80 % (v/v) Formamid, 10 mM EDTA, 0.025 % (w/v) Bromphenolblau, 0.025 % (w/v) Xylencyanol) bei 90 °C für 5 min inkubiert. Die Elektrophorese fand bei einer angelegten Spannung von 1.5 kV statt. Sobald das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen. Das Gel wurde mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und dann auf 3MM Whatman-Papier abgeklatscht und getrocknet. Mit der anschließenden autoradiographischen Detektion wurden die DNA-Banden auf einen Röntgenfilm abgebildet (Abb. 3.2 in 3.1.2).

## 2. 3. 5 Sequenzspezifische Markierung der DNA

Unter 1.3 wurde gezeigt, dass superhelikale DNA sequenzspezifisch über triplexbildende Oligonukleotide (TFOs) markiert werden kann (Pfannschmidt *et al.*, 1996). Die TFOs bestehen aus einer einzelsträngigen 25 bzw. 27 bp Homopyrimidinsequenz, die an eine komplementäre Homopurinsequenz in doppelsträngiger DNA unter Bildung eines DNA-Triplex hybridisiert.

Über eine 5'-Modifikation der TFOs mit dem in die DNA interkalierenden Psoralen kann der Marker durch UV-Bestrahlung kovalent mit der DNA verknüpft werden.

Die Ausgangsplasmide enthielten bereits die Homopurin•Homopyrimidinsequenz (*pu•py*) H1, die spezifisch für das Oligonukleotid TFO 3 ist (Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998). Durch die Subklonierung einer zweiten TFO-Erkennungsstelle sollten alle Plasmide an zwei Positionen über TFOs markiert werden können. Dabei sollten beide Erkennungssequenzen für je ein TFO spezifisch sein, so dass gegebenenfalls zwei verschiedene Marker in die DNA eingefügt werden können und außerdem wahlweise eine einfache oder eine zweifache Markierung erfolgen kann. Der Aufbau und die Sequenzen der verwendeten TFOs sowie die Bezeichnung der dazu jeweils spezifischen Erkennungssequenzen in den Plasmiden sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

**Tab. 2.2** Sequenzen der verwendeten TFOs und Bezeichnung der zugehörigen Erkennungssequenz<sup>1</sup>

Oligonukleotid	Aufbau	Erkennungssequenz
TFO3 <sup>2</sup>	C6-Psoralen-5'-TTCCTCCTTCCTT- CCTTCCTTCCTCCC-3'-Biotin -	H1
TFO4	C6-Psoralen-5'-TCTCTTCTCTCTC- CTCTCTCTCCCTTC-3'-Biotin	H2
TFO6	C6-Psoralen-5'-TCTCTTCTCTCTC- CTCTCTCCCTTC-3'-Biotin	H4

1. Dass die Bezeichnung der TFOs sowie der Erkennungssequenzen nicht von 1 an fortlaufend ist, beruht auf der Existenz anderer Sequenzen, die hier nicht verwendet wurden.

2. (Pfannschmidt *et al.*, 1996).

Zur Markierung wird die Plasmid-DNA in einem Konzentrationsbereich von 60-250 nM mit einem 20fachen TFO-Überschuss bei pH 5.0 inkubiert. Es findet eine spezifische Hybridisierung der TFOs an die jeweilige *pu•py*-Erkennungssequenz statt. Die TFOs sind am 5'-Phosphatende über eine (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-Gruppe (*Spacer*) mit dem DNA-interkalierenden Psoralen modifiziert. Das Psoralen geht unter UV-Bestrahlung bevorzugt eine Bindung mit Pyrimidinen ein, die im DNA-Strang in einer 5'-TpA-3'-Konfiguration vorliegen (Cimino *et al.*, 1985). Die



### 2. 3. 6 Gelfiltration von biotinylierter DNA

Für Titrationsexperimente (siehe Absch. 3.7) war es erforderlich, die in einem Biotinylierungsansatz vorhandenen ungebundenen TFOs vollständig von der markierten Plasmid-DNA zu trennen. Dazu wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, wobei als Trennmedium Superose 6 der Firma Pharmacia verwendet wurde.

An den Grund einer Pasteurpipette wurde zunächst etwas Glaswolle gestopft. Die Pipette wurde mit etwa 1.5 ml des aufgeschwämmten Trennmediums befüllt. Nachdem das Medium vollständig absedimentiert war, wurde die so hergestellte Säule mit zwei Gelvolumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA) gespült. 20 µg DNA in 100 µl TE-Puffer wurden auf die Säule gegeben und sobald die Probe in die Gelmatrix eingetreten war, wurde die Säule wieder mit TE-Puffer gefüllt. Es wurden 10 Fraktionen von je 200 µl gesammelt, von denen jeweils 8 µl zur Detektion der Plasmid-DNA auf ein Agarosegel geladen wurden.

### 2. 3. 7 Bindungsansätze mit Streptavidin-Peroxidase und biotinylierter DNA

Komplexe zwischen Streptavidin-Peroxidase (Strept-POD) und biotinylierter DNA wurden gelelektrophoretisch oder rasterkraftmikroskopisch untersucht. Dazu wurden Strept-POD-Bindungsansätze hergestellt.

Ein 10 µl Bindungsansatz enthielt in TMNE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 5 mM Mg-acetat, 50 mM  $\text{NH}_4^+$ -acetat, 1 mM EDTA, pH 7.2) 0.6 pmol biotinylierte Plasmid-DNA und ca. 6 pmol Strept-POD. Die Ansätze wurden für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, daraufhin wurden 45 nM Biotin zugesetzt.

### 2. 3. 8 Titration von biotinylierter DNA mit Strept-POD

Die Bindungsaktivität von Strept-POD bezüglich biotinylierter DNA wurde in Titrationsexperimenten untersucht. Dazu wurden Bindungsansätze mit variierenden Strept-POD-Konzentrationen und 0.6 pmol der mittels Gelfiltration aufgereinigten biotinylierten DNA hergestellt. Nach den Angaben des Herstellers (Pierce) sollte die Stammlösung 1 µg/µl bzw. 7 pmol/µl Strept-POD enthalten. In zwei unabhängigen Experimenten wurden Bindungsansätze mit jeweils 0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 µl einer Verdünnung der Strept-POD-Stammlösung (1:20 bzw. 1:40) hergestellt. Ansätze mit starkem Überschuss an Strept-POD wurden mit 1.0 und 2.0 µl

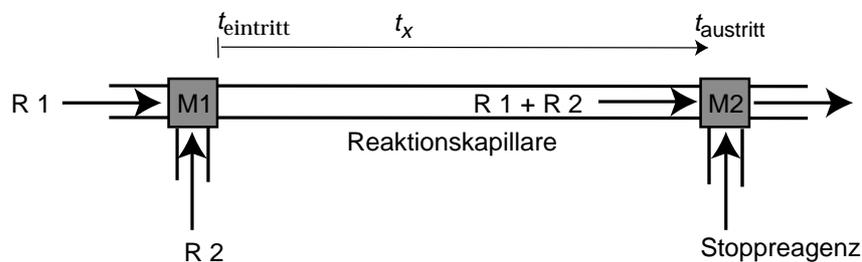
der Stammlösung hergestellt. Die Inkubation fand in TMNE-Puffer (s. 2.3.7) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach der Inkubation wurde 45 nM Biotin zugegeben.

## 2.4 Quench-Flow-Reaktionen

### 2.4.1 Funktionsweise des Quench-Flow-Moduls

Das Quench-Flow-Modul ist ein Instrument zur Messung von Reaktionskinetiken im Millisekundenbereich. Eine hohe Zeitauflösung erfordert eine schnelle, effiziente Vermischung der Reaktionspartner. Weiterhin muss nach sehr kurzen Zeitintervallen nach der Initiierung einer Reaktion die Konzentrationsänderung der Reaktanten als Funktion der Zeit beobachtet werden können. Bei den Flusstechniken wie die des Quench-Flow-Geräts wird eine gute Mischeffizienz durch eine Minimierung des Mischvolumens und eine hohe Geschwindigkeit, mit der Lösungen in Kontakt treten, erreicht. Kurze Zeitintervalle können definiert werden, indem ein Reaktionsgemisch sehr schnell von einem Ort der Reaktionsinitiierung zu einem Detektionspunkt gebracht wird.

In solchen Instrumenten fließen die Reaktionslösungen durch Röhren mit geringem Durchmesser (Kapillaren) und passieren dabei eine entsprechend kleine Mischkammer, in der sie in Kontakt gebracht und vermischt werden. Das Mischvolumen ist damit im Vergleich zum Gesamtvolumen lokal gering. Die Mischkammer erzeugt eine starke Turbulenz, so dass eine sofortige Vermischung der Lösungen erfolgt. Die erforderlichen hohen Flussgeschwindigkeiten werden durch motor- oder druckluftgetriebene Spritzen erreicht.



**Abb. 2.4** Prinzip der *quenched-flow*-Technik

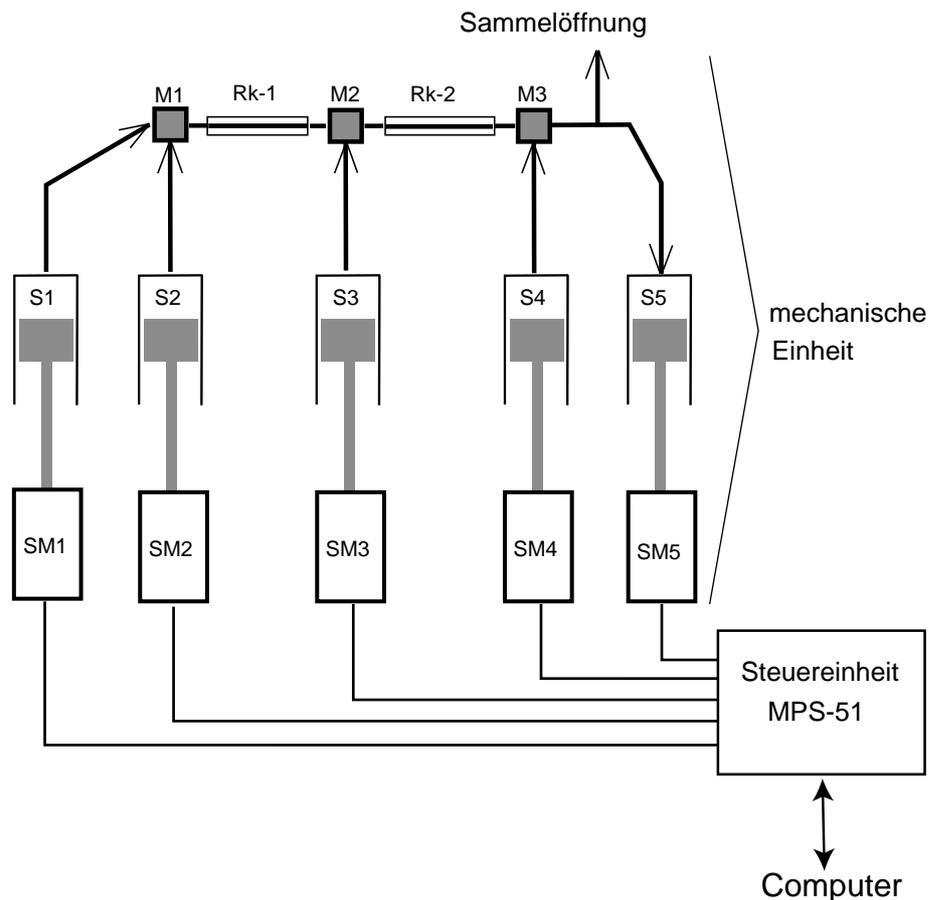
Die Reaktionslösungen R1 und R2 werden im Mixer M1 vermischt, das Gemisch passiert die Reaktionskapillare und wird im Mixer M2 mit einem Stoppreagens vermischt. Die Reaktion findet in der Zeit von  $t_{\text{eintritt}}$  bis  $t_{\text{austritt}}$  statt. In der Reaktionskapillare entspricht jeder Abstand vom Mixer M1 einer abgelaufenen Zeit  $t_x$  der Reaktion, die in Flussrichtung linear ansteigt.

Die Reaktion erfolgt fortlaufend ab dem Punkt der Durchmischung, während das Reaktionsgemisch durch die Kapillare fließt. Abhängig von der Flussgeschwindigkeit entspricht deshalb jede Distanz von der Mischkammer einer bestimmten Reaktionszeit. Die Konzentrationsänderung eines Reaktionsprodukts als Funktion der Zeit kann auf unterschiedliche Weise beobachtet werden (Gutfreund, 1969): Es kann z. B. mit einer spektroskopischen Methode die Konzentration an verschiedenen Stellen in der Kapillare während eines kontinuierlichen Flusses gemessen werden (*continuous-flow*-Technik). Bei einer anderen Technik, der *stopped-flow*-Technik, wird der Fluss angehalten und die Konzentration wird an einer einzigen Stelle zeitabhängig gemessen. Bei der *quenched-flow*-Technik wird eine Reaktion durch Zugabe eines Stoppreagenzes in einer zweiten nachgeschalteten Mischkammer nach definierten Zeitintervallen abgebrochen (*quenching*). Die Reaktion erfolgt in der Reaktionskapillare zwischen beiden Mixern während des fortlaufenden Flusses, der auch unterbrochen werden kann (s. unten), und endet bei Eintritt in den zweiten Mixer (Abb. 2.4). Die Reaktionszeit ist also, entsprechend der oben genannten Detektionsmodi, durch die Distanz der zweiten Mischkammer vom Punkt der Reaktionsinitiierung und durch die Flussgeschwindigkeit definiert. Man erhält eine Reihe von Proben, die dann mit einer geeigneten Methode zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktionskinetik der Bindung von Strept-POD an biotinylierte DNA mit der *quenched-flow*-Methode unter Verwendung des Quench-Flow-Moduls QFM-5 (Biologic) gemessen. In diesem Gerät werden die Lösungen durch schrittmotorgetriebene Spritzen durch die Kapillaren befördert. Der Aufbau des gesamten Quench-Flow-Systems ist in Abb. 2.5 schematisch dargestellt. Insgesamt aus vier Spritzen können Lösungen in das System gegeben werden, das zwei aufeinander folgende Reaktionskapillaren und drei Mischkammern enthält. Definierbare Aliquots des Lösungsgemischs können dem Gerät entnommen oder durch eine fünfte Spritze aufgenommen werden.

Die Impulsgabe an die Schrittmotoren erfolgt durch eine Steuereinheit, die alle Motoren durch voneinander unabhängige Mikroprozessoren ansteuert. Über einen Computer, mit dem die Steuereinheit ebenfalls verbunden ist, werden die Bewegungen der Spritzen in Form eines Sequenzprogramms bestimmt (s. 2.4.2). Dieses ist in Phasen aufgeteilt, für die jeweils ein Zeitintervall  $t$  und das von jeder Spritze in dieser Zeit zuzugebende Volumen  $V$  definiert wird. Für jede Phase wird außerdem angegeben, ob das beförderte Volumen von der fünften Spritze aufgenommen werden soll, oder ob es, bei einem Stillstand dieser Spritze, durch die Sammelöff-

nung entnommen werden soll. Für eine Einzelreaktion wird eine programmierte Sequenz einmal durchlaufen.



**Abb. 2.5** Schematische Darstellung des Quench-Flow-Moduls QFM-5

Das System umfasst zwei Komponenten. Die erste ist die mechanische Einheit, in der die Vermischung der Lösungen stattfindet. Diese besteht aus den Spritzen S1-5, die durch die Schrittmotoren SM 1-5 angetrieben werden, und dem Kapillarsystem mit den Mixern M1-3 und den zwei Reaktionskapillaren Rk-1 und Rk-2. Die zweite Komponente ist die Steuereinheit MPS-51, durch die eine mikroprozessorgesteuerte Impulsgabe an die Schrittmotoren erfolgt. Die Steuereinheit steht mit einem Computer in Verbindung, über den die Schrittmotorbewegungen programmiert werden.

Die Eigenschaften der Schrittmotoren und die darauf abgestimmte elektronisch gesteuerte Impulsgabe ermöglichen eine hohe Genauigkeit bei der Zugabe der definierten Volumina. Folgende Eigenschaften sind dabei entscheidend:

- Die Schrittmotoren können mechanisch 200 Einzelschritte pro Umdrehung ausführen. Durch die elektronische Ansteuerung erfolgt eine Mikropositionierung auf effektiv 6400 Einzelschritte pro Umdrehung, wobei ein Einzelschritt 0.094  $\mu\text{l}$  entspricht.

- Bei sehr langsamer Bewegung sorgt die Trägheit der Motoren für eine annähernd lineare Zugabe einer Lösung.
- Durch die Aufrechterhaltung der Spannung an den Motoren für eine Sekunde nach dem letzten Einzelschritt können die Motoren augenblicklich zum Stillstand kommen.

Zur Bestimmung der Reaktionszeit wird die Flussgeschwindigkeit (in m/s) als Flussrate  $F$  (in ml/s) ausgedrückt. Diese ist das in einem bestimmten Zeitintervall  $t$  durch die Reaktionskapillare beförderte Gesamtvolumen  $V_t$ . In einer Phase eines Sequenzprogramms ist

$$F = \frac{V_t}{t}. \quad (2.1)$$

Die effektive Reaktionszeit  $t_e$  bei einem kontinuierlichen Fluss durch die Reaktionskapillare ergibt sich dann aus:

$$t_e = \frac{V_R}{F}, \quad (2.2)$$

wobei  $V_R$  das Volumen der Reaktionskapillare ist. Zur Einstellung verschiedener Reaktionszeiten kann das Gerät in zwei Modi betrieben werden:

1.) Im kontinuierlichen Modus wird die Reaktionszeit über die Änderung der Flussrate  $F$  eingestellt. In den Phasen eines Sequenzprogramms werden die Zeitintervalle variiert, in denen ein gegebenes Gesamtvolumen  $V_t$  durch die Reaktionskapillare befördert wird. Für die Reaktionszeit gilt Gleichung 2.2.

2.) Im unterbrochenen Modus wird die Reaktionszeit durch eine Unterbrechung des Flusses für eine Zeit  $t_a$  eingestellt und die Flussrate wird konstant gehalten. Die Reaktionszeit bei einem unterbrochenen Fluss entspricht der Summe aus  $t_a$  und der Zeit, in der das Reaktionsgemisch die Reaktionskapillare bei gegebener Flussrate passiert:

$$t_{ae} = t_a + \frac{V_R}{F} \quad (2.3)$$

Das Volumen der Reaktionskapillare kann durch verschiedene Einsätze (*ageing-loops*) verändert werden, so dass  $V_R$  den zu messenden Reaktionszeiten angepasst werden kann.

## 2. 4. 2 Testmessungen mit Dinitrophenylacetat

Das Quench-Flow-Gerät wurde zu Beginn der Untersuchungen anhand einer Testreaktion charakterisiert. Eine geeignete Testreaktion ist die alkalische Hydrolyse von 2,4-Dinitrophenylacetat (DNPA) (Gutfreund, 1969). Die Esterbindung des DNPA wird in Anwesenheit von OH<sup>-</sup>-Ionen aufgespalten und es entstehen 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Acetat. Die Reaktion kann mit HCl im Überschuss gestoppt werden. Die Kinetik der DNPA-Hydrolyse wurde zum Vergleich auch unter Verwendung der *stopped-flow*-Technik gemessen, die weiter unten beschrieben wird.

### Quench-Flow-Messungen

Für die Testmessungen wurden 1.0 mM oder 1.5 mM DNPA verwendet. Die entsprechende Menge wurde in 2.5 ml DMSO aufgelöst und mit H<sub>2</sub>O vermischt. Es wurden verschiedene Mengen an NaOH eingesetzt, die jeweils aus einer 1.0 M Stammlösung verdünnt wurden. Als Stoppreagenz wurde 1.0 M HCl verwendet.

Bei allen Messungen der DNPA-Hydrolyse im Quench-Flow-Gerät wurde Spritze 1 mit H<sub>2</sub>O, Spritze 2 mit der DNPA-Lösung, Spritze 3 mit NaOH und Spritze 4 mit HCl befüllt. Das für die Analyse zu sammelnde Probenvolumen wurde in 1 ml-Plastikspritzen aufgenommen. DNPA wurde in Mixer M2 mit NaOH vermennt. Das Gemisch floss durch die Reaktionskapillare Rk-2 und wurde in Mixer M3 mit HCl vermennt, wobei die Hydrolyse gestoppt wurde. Verschiedene NaOH-Konzentrationen wurden durch Zugabe von H<sub>2</sub>O aus Spritze 1 und einer entsprechenden Verringerung des NaOH-Volumens eingestellt. Die Konzentration des Produkt DNP wurde anschließend durch Absorptionsmessungen bei 325 nm bestimmt (Gutfreund, 1969). Im Folgenden sind die Sequenzprogramme für die durchgeführten Testmessungen aufgeführt.

## I. Waschvolumen für die Reaktionskapillare

**Tab. 2.3** Sequenzprogramm 1

Phase:		I	II
Spritze	Zeit (ms):	$t$	15
<b>S1:</b> H <sub>2</sub> O	$V_{S1}$ (μl)	0	0
<b>S2:</b> DNPA	$V_{S2}$ (μl)	$V_x$	30
<b>S3:</b> NaOH	$V_{S3}$ (μl)	$V_x$	30
<b>S4:</b> NaCl	$V_{S4}$ (μl)	$V_x$	30
<b>S5:</b>	$V_{S5}$ (μl)	$-3 \times V_x$	0

Die Reaktionen erfolgten hier im kontinuierlichen Modus. Vor dem Sammeln der Probe wurde die Reaktionskapillare mit dem Reaktionsgemisch bei einer bestimmten Flussrate gespült. Hier wurde die Reaktionszeit konstant gehalten und es wurden verschiedene Waschvolumina zugegeben (DNPA-Konzentration in S2: 1.5 mM; NaOH-Konzentration in S3: 0.4 M).

**Phase I** (Waschphase): Zugabe von variierenden Waschvolumina  $V_x$  von allen Lösungen in das Kapillarsystem (pro Spritze 6-75 μl). Die Menge  $3 \times V_x$  wurde von Spritze 5 aufgenommen.  $t$  wurde für jedes  $V_x$  so angepasst, dass die Flussrate ( $4 \mu\text{l}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) und damit die Reaktionszeit konstant blieb und derjenigen in Phase II entsprach. Das Volumen in Rk-2 war 24 μl, damit betrug die gewählte Reaktionszeit 6 ms (siehe Gleichung 2.2) .

**Phase II:** Zugabe jeweils weiterer 30 μl aller Lösungen und Sammeln von 90 μl des gestoppten Reaktionsgemischs (Stillstand von Spritze 5).

## II. Reaktionen im kontinuierlichen Modus

**Tab. 2.4** Sequenzprogramm 2 a)

Phase:		I	II
Spritze	Zeit (ms):	$t_1$	$t_2$
<b>S1:</b> H <sub>2</sub> O	$V_{S1}$ (μl)	x	x
<b>S2:</b> DNPA	$V_{S2}$ (μl)	90	240
<b>S3:</b> NaOH	$V_{S3}$ (μl)	90 - x	240 - x
<b>S4:</b> HCl	$V_{S4}$ (μl)	90	240
<b>S5:</b>	$V_{S5}$ (μl)	-270	0

Tab. 2.5 Sequenzprogramm 2 b)

	Phase:	I	II
Spritze	Zeit (ms):	$t_1$	$t_2$
S1: H <sub>2</sub> O	$V_{S1}$ (μl)	x	x
S2: DNPA	$V_{S2}$ (μl)	300	300
S3: NaOH	$V_{S3}$ (μl)	300 - x	300 - x
S4: HCl	$V_{S4}$ (μl)	300	300
S5:	$V_{S5}$ (μl)	-900	0

Der Aufbau dieser Sequenzprogramme entspricht dem Programm 1 für die Bestimmung des Waschvolumens. Hier wurde jedoch das Waschvolumen in Phase I konstant gehalten und es wurden die Zeitintervalle der Phasen I und II variiert, um verschiedene Reaktionszeiten zu definieren. Das Volumen der Reaktionskapillare war 24 μl für das Programm 2 a) und es wurden Reaktionszeiten von 6-120 ms eingestellt. Für das Programm 2 b) war das Volumen der Reaktionskapillare 217 μl; die gewählten Reaktionszeiten waren 50-723 ms. Die Reaktionszeiten berechnen sich nach Gleichung 2.2. Um verschiedene NaOH-Endkonzentrationen einzustellen, wurde H<sub>2</sub>O aus Spritze 1 zugesetzt, das Volumen des zugegebenen NaOH wurde um denselben Betrag verringert (DNPA-Konzentration in S2: 1.0 mM; NaOH-Konzentration in S3: 0.5 M).

### III. Reaktionen im unterbrochenen Modus

Tab. 2.6 Sequenzprogramm 3

	Phase:	I	II	III	IV	V	VI
Spritze	Zeit (ms):	14	73	$t_a$	16	40	80
S1: H <sub>2</sub> O	$V_{S1}$ (μl)	0	0	0	48	120	440
S2: DNPA	$V_{S2}$ (μl)	21	110	0	0	0	0
S3: NaOH	$V_{S3}$ (μl)	0	110	0	0	0	0
S4: HCl	$V_{S4}$ (μl)	0	110	0	16	0	0
S5:	$V_{S5}$ (μl)	-21	-330	0	-64	0	-440

Mit diesem Sequenzprogramm wurde die Reaktionskapillare nicht durch Vorlegen des Reaktionsgemischs sondern durch Zugabe von H<sub>2</sub>O aus Spritze 1 nach jeder Einzelreaktion gespült. Das Reaktionsgemisch wurde ebenfalls durch H<sub>2</sub>O-Zugabe aus der Kapillare herausbefördert. Das Volumen der Reaktionskapillare betrug 217 µl; die Flussrate  $F$  war in allen Phasen konstant (3 µl/ms). (DNPA-Konzentration in S2: 1.5 mM; NaOH-Konzentration in S3: 0.5 M)

**Phase I:** Die DNPA-Lösung in Spritze 2 wurde bis zum Mixer M2 befördert (vgl. Abb. 2.5). Das Volumen zwischen Spritze 2 und Mixer 2 beträgt bei Verwendung eines 7 µl-Einsatzes in Rk-1 ca. 21 µl (Angabe des Herstellers).

**Phase II:** Die Reaktionskapillare wurde mit den Reaktionslösungen gefüllt.

**Phase III:** Der Fluss wurde für die Zeit  $t_a$  unterbrochen. Es wurden Zeiten von 0-3200 ms eingestellt; die effektiven Reaktionszeiten ergeben sich nach Gleichung 2.3.

**Phase IV:** Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O aus Spritze 1 wurde ein Teil des Reaktionsgemischs aus der Reaktionskapillare befördert und von Spritze 5 aufgenommen. Diese Fraktion befand sich während Phase III in der Nähe des Mixers 2 und konnte daher mit dem Stoppreagenz kontaminiert sein.

**Phase V:** 120 µl des Reaktionsgemischs wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O aus der Reaktionskapillare herausbefördert und gesammelt.

**Phase VI:** Die Reaktionskapillare wurde mit 440 µl H<sub>2</sub>O gespült.

### Stopped-Flow-Messungen

Die DNPA-Hydrolyse wurde zusätzlich in einem Stopped-Flow-Gerät (Biologic, Claix, Frankreich) gemessen. Der Aufbau des verwendeten Geräts ist dem Quench-Flow-Gerät ähnlich. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass eine Reaktion nicht chemisch gestoppt wird. Das Reaktionsgemisch gelangt direkt aus dem Kapillarsystem in eine Küvette, der Fluss wird angehalten und der Konzentrationsverlauf des Reaktionsprodukts wird in der Küvette spektroskopisch detektiert. Mit einem Computerprogramm (Biokine, Version 2.00, Biologic, Claix, Frankreich) wird die Konzentrationsänderung als Funktion der Zeit registriert. Die optischen Komponenten sind eine Xenon (Hg)-Lampe, ein Monochromator und eine optische Glasfaser, über die das monochromatische Licht an die Küvette transportiert wird. Die Lichtintensität nach Durchtritt durch die Küvette wird durch einen Photomultiplier detektiert. Die mechanische Einheit dieses Geräts enthält drei Spritzen und zwei Mischkammern. Die Spritzen werden

über dasselbe Computerprogramm kontrolliert, das auch beim Quench-Flow-Gerät verwendet wird (MPS-Software, Biologic, Claix, Frankreich).

Um die Kinetik der DNPA-Hydrolyse im Stopped-Flow-Gerät zu beobachten, wurden 1.0 mM DNPA mit NaOH (Spritze mit 0.5 M befüllt) in verschiedenen Konzentrationen vermischt. Durch Zusatz von H<sub>2</sub>O aus einer dritten Spritze und eine entsprechende Verminderung der NaOH-Menge wurde die NaOH-Endkonzentrationen verändert. Der Monochromator wurde auf 325 nm eingestellt. Ähnlich dem kontinuierlichen Modus im Quench-Flow-Gerät (siehe Tab. 2.4 und 2.5) wurde das Kapillarsystem und die Küvette mit dem Reaktionsgemisch gewaschen bis die Lichtintensität auf einen gleichbleibenden Wert gestiegen war (nach 260 ms). Dann wurde der Fluss gestoppt und die Änderung der Lichtintensität wurde weiter aufgezeichnet. Für jede NaOH-Konzentration wurden 10 Einzelreaktionen aufgenommen und die Intensitätswerte gemittelt. Die Lichtintensitäten wurden dann nach folgender Beziehung in Absorptionswerte umgerechnet.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_D}\right). \quad (2.4)$$

Dabei ist  $A$  die Absorption,  $I_0$  die Lichtintensität zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Kinetik und  $I_D$  die Lichtintensität zum Zeitpunkt  $t_x$ .

### 2. 4. 3 Reaktionen mit Strept-POD und einfach biotinylierter DNA

Um die Geschwindigkeitskonstante der Bindung von Strept-POD und einfach biotinylierter DNA im Quench-Flow-Gerät zu bestimmen, wurden Sequenzprogramme in Anlehnung an das oben beschriebene Programm 3 (Tab. 2.6) im unterbrochenen Modus erstellt. Die Konzentrationen der Reaktanten wurden so gewählt, dass (i) für eine gelelektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte eine ausreichende Menge an DNA vorhanden war und (ii) ein Überschuss an Strept-POD vorlag, der die Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung erlaubte (siehe 1.4). Als Stoppreagenz wurde Biotin in ~1000fachem Überschuss über Strept-POD eingesetzt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte hierbei durch eine sofortige Absättigung sämtlicher freier Biotinbindungsstellen.

Die folgenden Sequenzprogramme 4 a) und b) wurden für Reaktionen unter Verwendung von Volumina in Rk-2 von 217  $\mu$ l (a) und 117  $\mu$ l (b) erstellt (Tab. 2.7 und 2.8). Zur Einstellung der Reaktionszeiten wurden Unterbrechungsintervalle  $t_a$  von 0-2000 ms gewählt. Die Flussrate in

Rk-2 betrug 2  $\mu\text{l}/\text{ms}$ . Die Reaktionen fanden bei 26 °C statt. Nach den Reaktionen wurden die gesammelten Proben mittels Zentrifugation in Vivaspin-Säulen auf etwa 10  $\mu\text{l}$  eingeeengt.

Die Spritzen wurden wie folgt befüllt:

- **Spritze 1:**  $\text{H}_2\text{O}$
- **Spritze 2:** 15 nM DNA in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA. (Für die Konzentration der effektiv biotinylierten DNA siehe 3.5.2)
- **Spritze 3:** Strept-POD in 10 mM Tris/HCl, pH 7.2, 10 mM Mg-acetat, 100 mM  $\text{NH}_4$ -acetat, 1 mM EDTA (die Konzentration von Strept-POD ist in den Sequenzprogrammen angegeben)
- **Spritze 4:** 0.5 mM Biotin in  $\text{H}_2\text{O}$

**Tab. 2.7** Sequenzprogramm 4 a)

	<b>Phase:</b>	I	II	III	IV	V	VI
Spritze	<b>Zeit (ms):</b>	11	120	$t_a$	25	90	200
<b>S1:</b> $\text{H}_2\text{O}$	$V_{S1}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	50	180	440
<b>S2:</b> DNA	$V_{S2}$ ( $\mu\text{l}$ )	22	120	0	0	0	0
<b>S3:</b> Strept-POD (120 nM)	$V_{S3}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	120	0	0	0	0
<b>S4:</b> Biotin	$V_{S4}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	12	40	0
<b>S5:</b>	$V_{S5}$ ( $\mu\text{l}$ )	-22	-120	0	-25	0	-440

**Tab. 2.8** Sequenzprogramm 4 b)

	<b>Phase:</b>	I	II	III	IV	V	VI
Spritze	<b>Zeit (ms):</b>	11	60	$t_a$	10	50	150
<b>S1:</b> $\text{H}_2\text{O}$	$V_{S1}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	20	100	220
<b>S2:</b> DNA	$V_{S2}$ ( $\mu\text{l}$ )	22	60	0	0	0	0
<b>S3:</b> Strept-POD (160 nM)	$V_{S3}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	60	0	0	0	0
<b>S4:</b> Biotin	$V_{S4}$ ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	5	25	0
<b>S5:</b>	$V_{S5}$ ( $\mu\text{l}$ )	-22	-120	0	-25	0	-220

## 2. 4. 4 Reaktionen mit Strept-POD und zweifach biotinylierter DNA

Die Reaktionen zwischen Strept-POD und zweifach biotinylierter DNA erfolgten unter Verwendung des Sequenzprogramms 5 (Tab. 2.9). Hierbei wurden die Reaktionen nicht gestoppt; das Instrument diente lediglich zu einer homogenen Vermischung der Reaktionspartner. Die ersten beiden Phasen entsprachen dem Programm 4 b) (Tab 2.8). Das Gemisch wurde dann in Phase III direkt gesammelt. Die Reaktionen erfolgten bei 26 °C. Nach den Reaktionen wurden die Proben mit einem Überschuss an Biotin versetzt und, wie bei den gestoppten Reaktionen, durch Vivaspin-Zentrifugation eingeengt.

Die Spritzen wurden wie folgt befüllt:

- **Spritze 1:** H<sub>2</sub>O
- **Spritze 2:** 15 nM DNA in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA (für die Endkonzentration der effektiv zweifach markierten DNA siehe Abschn. 3.6.1)
- **Spritze 3:** 0.8 - 2.4 µM Strept-POD in 150 mM NaP<sub>i</sub>, 10 mM NaCl, pH 6.8
- **Spritze 4:** nicht verwendet (jedoch mit H<sub>2</sub>O befüllt)

**Tab. 2.9** Sequenzprogramm 5: Gleichgewichtsreaktionen

	<b>Phase:</b>	I	II	III	IV
Spritze	<b>Zeit (ms):</b>	11	60	60	150
<b>S1:</b> H <sub>2</sub> O	<b>V<sub>S1</sub> (µl)</b>	0	0	120	300
<b>S2:</b> DNA	<b>V<sub>S2</sub> (µl)</b>	22	60	0	0
<b>S3:</b> Strept-POD	<b>V<sub>S3</sub> (µl)</b>	0	60	0	0
<b>S4:</b> H <sub>2</sub> O	<b>V<sub>S4</sub> (µl)</b>	0	0	0	0
<b>S5:</b>	<b>V<sub>S5</sub> (µl)</b>	-22	-120	0	-300

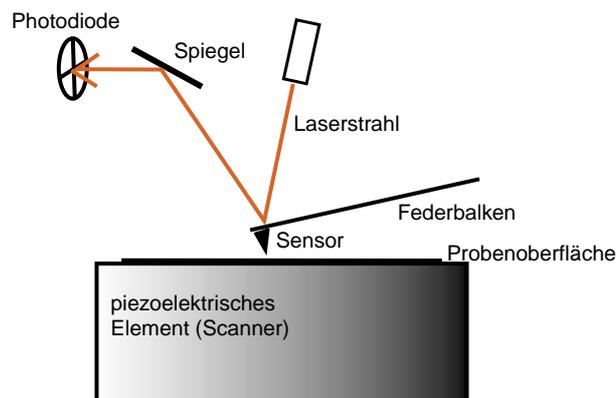
## 2. 5 Rasterkraftmikroskopie

Mittels des Rasterkraftmikroskops (SFM, *scanning force microscope*) wurden die Reaktionsprodukte von biotinylierter DNA und Strept-POD aus Quench-Flow-Reaktionen (2.4.3 und 2.4.4) und aus Bindungsansätzen (2.3.7 und 2.3.8) sichtbar gemacht. Es wurde bereits gezeigt, dass an DNA gebundenes Strept-POD durch die Rasterkraftmikroskopie dargestellt werden kann (Rivetti *et al.*, 1996; Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998).

## 2. 5. 1 Technische Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie

### Messprinzip

Im SFM wird die Oberfläche einer Probe durch einen Sensor mechanisch abgetastet. Der Sensor ist am Ende eines Federbalkens befestigt, auf dessen Rückseite ein Laserstrahl gerichtet wird. Der Laserstrahl wird durch den Federbalken reflektiert und trifft auf eine in vier Quadranten unterteilte Photodiode. Bereits sehr schwache Kräfte aufgrund von Wechselwirkungen zwischen der Sensorspitze und der Probenoberfläche verursachen eine Verbiegung des Federbalkens. Durch die daraus resultierende Auslenkung des reflektierten Laserstrahls werden die Quadranten der Photodiode mit unterschiedlichen Lichtintensitäten bestrahlt, was eine zur Stärke der Auslenkung proportionale Differenzspannung erzeugt. Da die Auslenkung des Laserstrahls gegenüber der Verbiegung des Federbalkens verstärkt wird, können Höhenunterschiede bereits von wenigen Å detektiert werden (Bustamante *et al.*, 1994). Die Probe wird durch ein piezoelektrisches Element (*Scanner*) zeilenweise unter dem Sensor bewegt, währenddessen die Auslenkungen des Federbalkens durch einen Computer aufgezeichnet und in ein topographisches Bild der abgetasteten Probenoberfläche umgerechnet werden. Abbildung 2.6 zeigt den schematischen Aufbau eines SFM. Die Rasterkraftmikroskopie, die 1986 von Binnig *et al.* (1986) entwickelt wurde, kann für die Darstellung von Biomolekülen angewendet werden (Bustamante *et al.* 1994; Bustamante & Rivetti 1996).

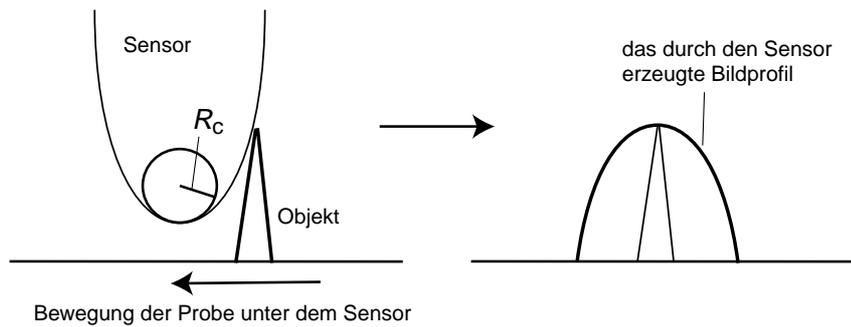


**Abb. 2.6** Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops

Bei der einfachsten Methode zur Abbildung einer Oberfläche steht der Sensor in einem dauernden Kontakt zur Probe (*contact mode*). Weiche Proben wie Biomoleküle sind dabei in Gefahr, durch Scherkräfte bei der Bewegung der Probe unter dem Sensor zerstört oder verschoben zu werden. Bei einem schonenderen Verfahren wird der Federbalken durch ein weiteres piezoelektrisches Element in vertikaler Richtung zum Schwingen gebracht und der Oberfläche gerade soweit angenähert, dass geringe Wechselwirkungen zwischen Sensor und Probenoberfläche am unteren Ende der Schwingungsbahn erfolgen können (*tapping mode*) (Hansma *et al.*, 1993). Kontakte zwischen Probe und Sensor sind damit sehr kurz, so dass auf ein Molekül kaum laterale Kräfte wirken. Die Detektion von Höhendifferenzen erfolgt hierbei über die Änderung der Schwingungsamplitude des Federbalkens, die durch den Photodetektor ebenso wie eine einmalige Auslenkung gemessen werden kann. Trifft der Sensor auf ein Objekt mit einer bestimmten Höhe, so erhöht sich die Kraft der Wechselwirkung und es verringert sich die Amplitude. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten SFM (Nanoscope III, Digital Instruments) wird ein Amplitudensollwert durch eine über einen Regelkreis gesteuerte Höhenkorrektur während des Abtastens konstant gehalten. Die Korrekturbewegungen, die von dem piezoelektrischen Element unter der Probe ausgeführt werden, ergeben nach Umrechnung durch einen Computer das topographische Bild der Probe.

### **Abbildung von Objekten**

Die Art der Abbildung und die Auflösung bei der rasterkraftmikroskopischen Darstellung ist einerseits durch Eigenschaften der Probe, andererseits durch das Messinstrument und hierbei insbesondere durch die Spitzengeometrie des Sensors bestimmt. Die Schärfe der Spitze, die als Krümmungsradius  $R_c$  ausgedrückt wird (Bustamante *et al.*, 1993), begrenzt deshalb das Auflösungsvermögen, weil das abgebildete Profil eines Objekts dem inversen parabolischen Profil der Sensorspitze entspricht (Abb. 2.7). Es ist daher ersichtlich, dass die Bildprofile von zwei nahe beieinander liegenden Objekten überlappen können und damit nicht vollständig getrennt wären. Sensoren aus Silizium besitzen normalerweise Endradii von etwa 10 nm. Damit können Objekte unterschieden werden, die 5-10 nm voneinander entfernt sind (Bustamante & Rivetti, 1996).



**Abb. 2.7** Diagramm der rasterkraftmikroskopischen Darstellung eines Objekts

## Glimmer

Um eine biologische Probe rasterkraftmikroskopisch darzustellen, müssen die Moleküle an eine Oberfläche gebunden werden. Als Substrat dafür kann Glimmer verwendet werden. Dies ist ein geschichtetes Material, dessen Hauptkomponenten tetraedrisch angeordnete  $\text{SiO}_4$ -Gruppen sind. Die Tetraeder bilden hexagonale, planare Strukturen (Phyllosilikate), die negativ geladen sind. Eine stabile Schichtung dieser Silikate wird über positiv geladene Metallionenkomplexe mit einer zu den Phyllosilikaten passenden geometrischen Struktur vermittelt. Da die Bindungskräfte in horizontaler Orientierung stärker sind als in vertikaler Orientierung, können leicht Schichten abgespalten werden. Nach der Spaltung erhält man eine atomar glatte negativ geladene Silikatoberfläche (Colton *et al.*, 1998). Die DNA wird in einem Puffer, der divalente Kationen enthält, auf den Glimmer gegeben. Wahrscheinlich binden die Kationen an die Glimmoberfläche, die dadurch eine positive Ladung erhält, in dessen Folge die negativ geladene DNA an der Oberfläche gebunden wird (Bustamante *et al.*, 1993). Der Transfer von DNA-Molekülen an die Oberfläche wird dabei ausschließlich durch Diffusion kontrolliert (Rivetti *et al.*, 1996).

### 2. 5. 2 Probenvorbereitung und Mikroskopie

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren wird die DNA getrocknet, nachdem sie auf den Glimmer gebunden wurde. Für eine quantitative Auswertung von Reaktionsprodukten ist dieses Verfahren geeignet, sofern die in einer Reaktion gebildeten Strukturen auf den SFM-Bildern eindeutig zugeordnet werden können.

Verwendete Bindungspuffer:

Puffer D1: 10 mM HEPES, pH 8.0, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>

Puffer D2: 10 mM HEPES, pH 8.0, 10-100 mM MgCl<sub>2</sub>

Zur Bindung der DNA wurden 1-2 µl einer 60 nM DNA-Lösung mit 20 µl Bindungspuffer (auf 50 °C erwärmt) und 1.5 µl 0.01 % (v/v) NP-P40 vermischt und auf frisch gespaltenen Glimmer getropft. Der Glimmer wurde sofort mit 50 ml Reinstwasser gespült, das über eine Seralpur PRO 90 CN-Reinstwasseranlage gewonnen wurde. Daraufhin wurde die Probe im N<sub>2</sub>-Strom für etwa 30 s getrocknet. Eine gute Ausbreitung der DNA-Moleküle auf dem Glimmer wurde durch Versuche mit verschiedenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen optimiert.

Es wurden geätzte Siliziumspitzen (L.O.T. Oriel, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die im *tapping mode* bei einer Anregungsfrequenz von 300-400 kHz betrieben werden. Die Federbalken weisen in diesem Frequenzbereich eine spezifische Resonanzfrequenz auf.

Zunächst wurde der Laserstrahl bei einer Ruhestellung des Federbalkens auf die Mitte der Photodiode fokussiert. Dazu wurde die Diode bewegt, bis die Differenzspannung in horizontaler und in vertikaler Orientierung den Wert Null einnahm. Die Parameter für die Abtastung der Oberfläche wurden wie folgt bestimmt: Die Amplitude der freien Schwingung des Federbalkens wurde bei einer Differenzspannung von 2-3 V festgelegt. Der Sensor wurde automatisch der Oberfläche angenähert, bis die Amplitude auf einen vorgegebenen Sollwert (*setpoint*) verringert war, der um ca. 250 mV unter der Spannung bei freier Schwingung lag. Bei diesem Sollwert, der die Kraft der Wechselwirkung zwischen Probe und Sensor bestimmt, fand die Abtastung der Oberfläche statt. Die Empfindlichkeit des *Scanners* gegenüber Höhendifferenzen wurde über die Parameter *proportional gain* (0.3-0.5) und *integral gain* (3-5) eingestellt. Es wurden Probenflächen von 3-5 µm<sup>2</sup> mit einer Geschwindigkeit von 2-3 Bildzeilen pro Sekunde abgetastet.

## 2.6 Auswertungen

### 2.6.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann absorptionspektrometrisch bestimmt werden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist bei gegebener Lichtwellenlänge die Absorption  $A$  einer Lösung, die einen absorbierenden Stoff enthält, der Schichtdicke  $d$  der Lösung und der Konzentration des absorbierenden Stoffs  $c$  proportional.  $A$  errechnet sich aus

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_D}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d, \quad (2.5)$$

wobei  $I_0$  die Intensität des einfallenden monochromatischen Lichts,  $I_D$  die detektierte Intensität des Lichts nach Durchtritt durch die Lösung und  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient des absorbierenden Stoffs bei gegebener Lichtwellenlänge ist.  $\varepsilon$  beträgt für Plasmid-DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm  $6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pro Basenpaar. Die Extinktion wird in der Einheit OD (optische Dichte) gemessen. 1 OD<sub>260</sub> bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Maniatis *et al.*, 1982). Für eine genaue Bestimmung der Konzentration von Oligonukleotiden müssen die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide berücksichtigt werden. Die Reinheit einer DNA-Lösung lässt sich durch das Verhältnis von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> nachweisen. Liegt es unter dem Wert 1.8, ist dies ein Hinweis auf eine Verunreinigung z. B. mit Proteinen oder Phenol (Maniatis *et al.*, 1982).

Zur Quantifizierung der DNA-Menge in Gelbanden wurde das Programm BioImage (Version 2.1.1) verwendet. Mit dem Programm werden die Graustufen eines digitalisierten Photos von einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel gemessen. Die Graustufen entsprechen den Leuchtintensitäten der durch das Ethidium fluoreszierenden Gelbanden. Die relative DNA-Menge wird dann durch Integration der Graustufen über definierte Flächen berechnet. Anhand eines Standards mit bekannter DNA-Menge, der mit auf das Gel aufgetragen wird, kann die absolute DNA-Menge in allen Banden bestimmt werden.

## 2. 6. 2 Analyse der intrinsischen Krümmung von DNA-Sequenzen

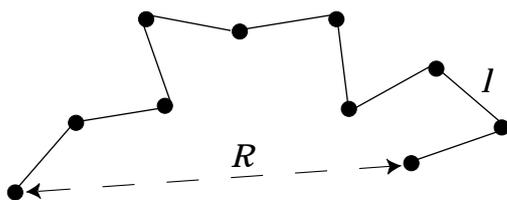
Mit dem Programm *Curvature* (Schätz, 1998) wurde die Gesamtsequenz der untersuchten Plasmide nach dem Algorithmus von Bolshoy *et al.* (1991) auf intrinsische Krümmung untersucht. Das Programm berechnet fortlaufend Krümmungseinheiten  $k$  für einzelne Basenpaarabschnitte, die um jeweils ein Basenpaar verschoben sind.  $k$  entspricht dem reziproken Radius des Bogens eines jeweiligen Sequenzbereichs. Grundlage für die Berechnung sind die durch den verwendeten Algorithmus vorhergesagten Dinukleotidparameter nach dem *wedge*-Modell (siehe 1.2.2). Durch eine Erweiterung des Programms durch Herrn Michael Habeck kann die berechnete Konformation einer Sequenz auch graphisch dargestellt werden.

## 2. 6. 3 Polymerstatistische Berechnungen

Wie unter 1.2.1 beschrieben, kann jedes genügend lange Polymer als eine Kette von gegeneinander beweglichen Segmenten angesehen werden. Sind die Segmente vollkommen frei beweglich, handelt es sich um eine statistische oder Gauss'sche Kette. Dafür kann der mittlere End-zu-Endabstand  $\langle R \rangle$  nach folgender Beziehung berechnet werden (Cantor & Schimmel, 1980):

$$\langle R^2 \rangle = nl^2. \quad (2.6)$$

$l$  entspricht der statistischen oder Kuhn-Segmentlänge eines Polymers, die gleich der zweifachen Persistenzlänge ist, und  $n$  ist die Anzahl der Segmente. Die Persistenzlänge beschreibt die Steifheit eines Polymers. Sie ist als die Länge definiert, über die das Polymer eine bestimmte Richtung beibehält oder nur leicht davon abweicht.  $n$  ergibt sich aus der Konturlänge  $L$  des Polymers dividiert durch die statistische Segmentlänge. Abbildung 2.8 beschreibt schematisch das Modell einer statistischen Kette.



**Abb. 2.8** Modell einer statistischen Kette  
Die zufällige Konformation der Kette bestimmt den End-zu-Endabstand  $R$ .

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten superhelikalen Moleküle wurde die lokale Konzentration  $j_M$  einer biotinylierten Stelle in der Umgebung der zweiten von Konstantin Klenin mit dem Programm *Corchy* berechnet (Klenin *et al.*, 1995). Für relaxierte Moleküle kann  $j_M$  mit diesem Computermodell nicht berechnet werden, da dafür außerordentlich lange Rechenzeiten erforderlich wären. Für nicht unter Torsionsspannung stehende ringförmige DNA kann  $j_M$  nach folgender Gleichung berechnet werden (Rippe, unveröffentlicht):

$$j_M(n) = 0.53 \cdot \left(n - \frac{n^2}{N}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot \exp\left(\frac{d-2}{\left(n - \frac{n^2}{N}\right)^2 + d}\right) \cdot l^{-3} \frac{\text{mol} \cdot \text{nm}^3}{\text{Liter}} \quad (2.7)$$

$l$  ist wie in Gleichung 2.6 definiert.  $n$  ist hier die Anzahl der Segmente zwischen den wechselwirkenden Orten, für die  $j_M$  berechnet werden soll, und  $N$  ist die Gesamtzahl der Segmente des Moleküls.  $d$  ist ein Faktor, durch den erleichterte intramolekulare Kontakte aufgrund vergrößerter Reaktionsradii oder DNA-Krümmung berücksichtigt werden können.

#### 2. 6. 4 Berechnung des Durchmessers von Proteinen

Mit Hilfe des Computerprogramms *Sedenterp* (vrs. 1.05, J. Philo, D. Hayes, T. Laue) wurde der Durchmesser von Streptavidin und des gesamten Streptavidin-Peroxidase-Konjugats (vgl. 2.1.2) zu einer näheren Charakterisierung des untersuchten Reaktionssystems berechnet. Auf der Grundlage der gesamten Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm das partialspezifische Volumen  $v_{\text{bar}}$  und das Molekulargewicht  $M$  des Proteins berechnet. Es wurde der Hydratisierungsgrad berücksichtigt, indem die Masse  $M_{\text{hydr}}$  des pro mol Protein gebundenen  $\text{H}_2\text{O}$  berechnet wurde. Die verwendeten Sequenzen stammten aus der SwissProt-Datenbank (Zugangsnummern: Streptavidin P22629; Peroxidase P17179). Da  $v_{\text{bar}}$  der reziproken Dichte entspricht, ergibt sich das molare Volumen  $V$  des hydratisierten Proteins unter der Annahme einer Dichte  $\delta = 1 \text{ cm}^3/\text{g}$  von  $\text{H}_2\text{O}$  wie folgt:

$$V = M \cdot v_{\text{bar}} + V_{\text{hydr}} \quad (2.8)$$

# 3. Ergebnisse

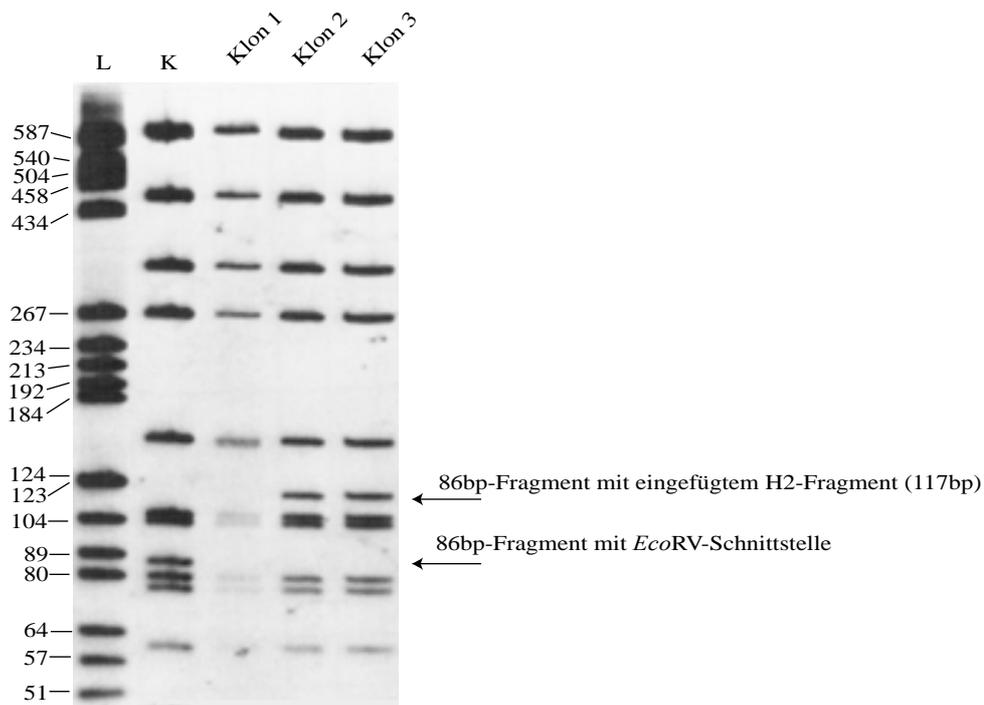
## 3.1 Charakterisierung der untersuchten DNA

### 3.1.1 Überprüfung der Klonierungen

Die Ausgangsplasmide, pUC18-1A-H1-E, pUC18-4A-H1-E und pUC18-5/6A-H1-E (Pfannschmidt, 1998), enthielten zur sequenzspezifischen Biotinylierung über TFOs die für das TFO 3 spezifische Erkennungssequenz H1. Um eine intramolekulare Vernetzungsreaktion zwischen zwei biotinylierten Sequenzpositionen über ein Strept-POD zu untersuchen, war es notwendig, eine zweite Erkennungssequenz in die Plasmide einzufügen. In alle Ausgangsplasmide wurde daher die *pu•py*-Sequenz H2 in die Einzelschnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRV* eingefügt. In pUC18-5/6A-H1-E wurde die *pu•py*-Sequenz H4 in die Einzelschnittstelle des Enzyms *SapI* kloniert. In dem daraus entstandenen Plasmid (pUC18-5/6A-H1/4-E) wurde außerdem zwischen der gekrümmten *ClaI*-Insertion und der neuen H4-Sequenz das 48 bp große I-Fragment in die *EcoRV*-Schnittstelle eingefügt (siehe Klonierungsschemata in Abb. 2.1 und 2.2). Auf diese Weise lagen Plasmide des A<sub>5-6</sub>-Typs mit verschiedenen Biotinylierungspositionen in Relation zur Krümmungsinsertion vor. Im Anhang (7.1) sind die Restriktionskarten der entstandenen Plasmide unter Angabe aller Einzelschnittstellen und der Schnittstellen für die in den Untersuchungen verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt. Es sollte hier angemerkt werden, dass eine Doppelmarkierung bereits in den Ausgangsplasmiden über eine Kombination aus Triplexbildung und einem Nick-Translationsverfahren möglich ist (Pfannschmidt & Langowski, 1998). Zu einer Markierung der für die geplanten Quench-Flow-Reaktionen erforderlichen großen Probenmengen erwies sich eine Doppelmarkierung über TFOs jedoch als geeigneter.

Die Vektor-DNA wurde mit dem einzubringenden Fragment ligiert, das zu der jeweiligen Vektor-DNA komplementäre Enden aufwies. Die Bakterienzellen wurden mit der DNA eines Ligationsansatzes transformiert und nach Klonierung und Vermehrung der Transformanten wurde die Plasmid-DNA über die Minipräparation isoliert. Die Plasmide wurden mit den Enzymen *HaeIII* und *HinfI* gespalten und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Anhand der im Gel aufgetrennten Spaltprodukte wurden die mit dem Fragment ligierten Klone identifi-

ziert. Abbildung 3.1 zeigt dies am Beispiel der Klonierung des Fragments H2 in pUC18-1A-H1-E. In den positiven Klonen wurde dann mittels Sequenzierung in einem automatischen Sequenziergerät (siehe 2.3.3.) die Orientierung der Fragmente H2 und H4 in den Plasmiden bestimmt (Tab. 3.1).



### Abb. 3.1 Überprüfung der Ligation

Das Ausgangsplasmid pUC18-1A-H1-E wurde mit *EcoRV* gespalten und dann mit dem Fragment H2 ligiert. Gezeigt ist die Plasmid-DNA in einem 8 %igen Polyacrylamidgel nach Restriktionsspaltung mit den Enzymen *HaeIII* und *Hinfi*. Aufgrund der Verlängerung des 86 bp-Fragments um die 31bp lange H2-Sequenz entstand das neue 117 bp lange Fragment in den positiven Klonen 2 und 3. Klon 1 war negativ, da trotz des Verschwindens des 86 bp-Fragments kein neues Fragment erkennbar war. Hier hat wahrscheinlich eine Multimerisierung der H2-Fragmente stattgefunden.

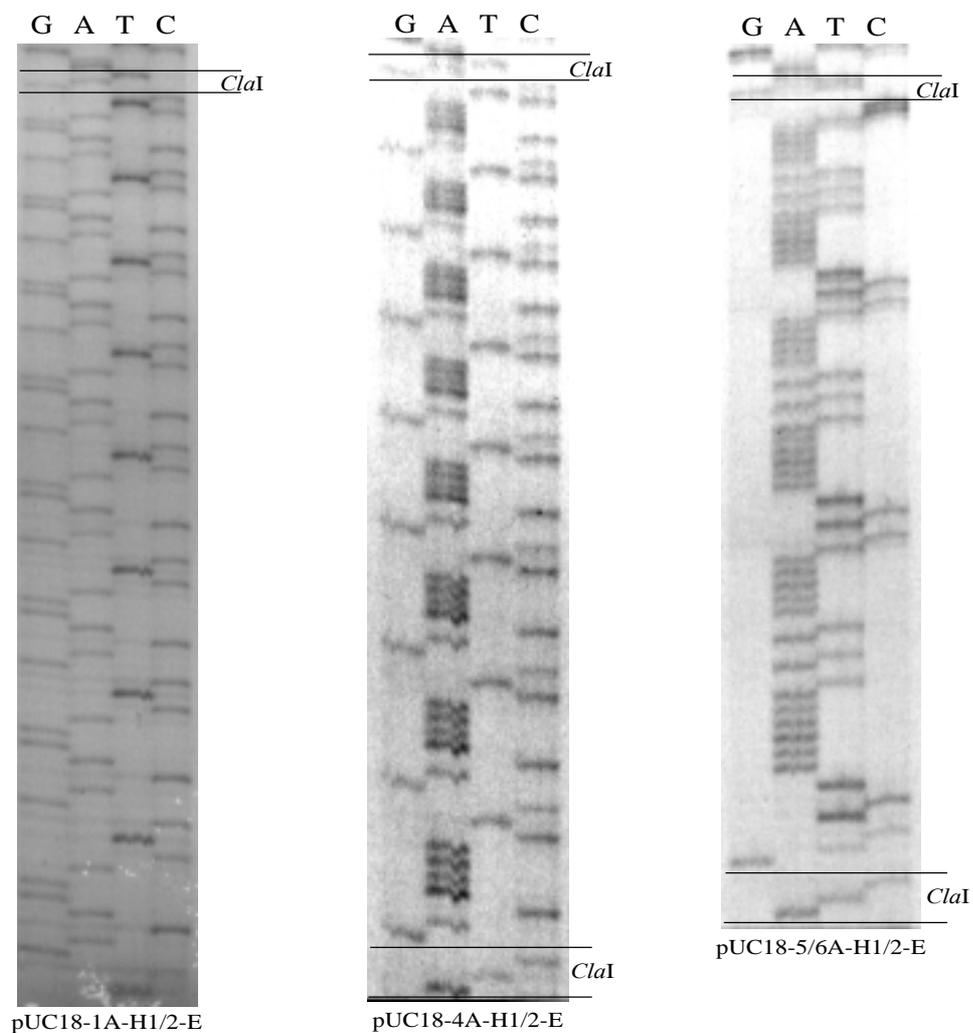
Die Insertion des I-Fragments in die *EcoRV*-Schnittstelle in pUC18-5/6A-H1/4-E wurde ebenfalls durch Sequenzierungen überprüft. Das Fragment sollte nach Auffüllen der 3'-rezessiven Enden mit Klenow-Enzym eine Länge von 53 bp besitzen. Die Sequenzierung ergab jedoch eine Verlängerung der Basensequenz des Plasmids um nur 51 bp, was auf das Fehlen eines Adenins an Position 28 und eines Cytosins an Position 53 innerhalb des eingefügten Fragments zurückzuführen war.

**Tab. 3.1** Orientierung der TFO-Bindungsstellen in den Plasmiden

Plasmid	Fragment	Sequenz <sup>1</sup>
pUC18-XA-H1/2-E X = 1A, 4A und 5/6A	H2	5'- <i>EcoRV</i> -CTTCCCTCTCTCTCCTCTCTCTCCTC- TATAG- <i>EcoRV</i> -3'
pUC18-5/6A-H1/4-E pUC18-5/6A-H1/4-I/E	H4	5'- <i>SapI</i> -TATAGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGG- GAAG- <i>SapI</i> -3'

1. Die Sequenzen beziehen sich auf den ersten Strang der Plasmide

### 3. 1. 2 Überprüfung der *ClaI*-Insertionen

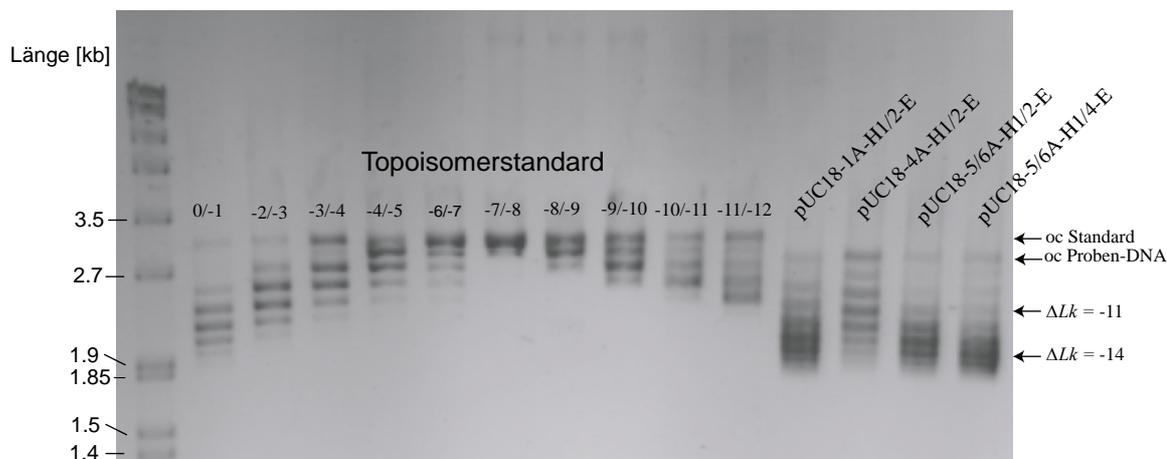
**Abb. 3.2** Sequenzierungen der *ClaI*-Insertionen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die *ClaI*-Insertionen, die in den Plasmiden des Typs  $A_4$  und  $A_{5-6}$  die sequenzinduzierte Krümmung hervorrufen, durch Sequenzierungen verifiziert (siehe 2.3.3). Die Sequenziergele (Abb. 3.2) zeigten, dass in den bearbeiteten Plasmiden die Sequenzen der *ClaI*-Insertionen mit den ursprünglich angegebenen Sequenzen übereinstimmen (Kremer, 1992; Kremer *et al.*, 1993). Neun Basen am 5'-Ende der Insertion in pUC18-1A-H1/2-E waren allerdings auf dem autoradiographischen Bild des Sequenziergels nicht lesbar, die Sequenz stimmte im Übrigen jedoch mit der angegebenen Sequenz überein. Wurde dieses Plasmid mit *HaeIII* geschnitten, zeigte sich nach Elektrophoresen in Polyacrylamidgelen, dass das die *ClaI*-Insertion enthaltende *HaeIII*-Fragment an die für die angegebene Größe zu erwartende Position wanderte.

### 3. 1. 3 Präparation der superhelikalen Plasmid-DNA

Die zur Bearbeitung ausgewählte Plasmid-DNA wurde, wie unter 2.2.4 angegeben, vermehrt und per Maxipräparation (2.3.1) aus den angezüchteten Bakterien isoliert. Nach anschließender HPLC-Aufreinigung (2.3.1) betrug der Anteil an superhelikaler DNA > 95 %.

Nach der 'band-counting'-Methode (Keller, 1975) wurden die Verbindungsdifferenzen  $\Delta Lk$  der isolierten Plasmide ermittelt (siehe 2.3.4): Dazu wurden mit der Plasmid DNA Agarosegelelektrophoresen mit Chloroquinzusatz durchgeführt (Abb. 3.3). Neben einem Topoisomerstandard wurde die isolierte DNA aufgetragen, die damit bestimmten  $\Delta Lk$ -Werten zugeordnet werden konnte. Dabei war zu beachten, dass sich die Größen des verwendeten Standards und der Proben-DNA leicht unterschieden. Die  $\Delta Lk$ -Werte wurden daher ausgehend von den Banden der ringoffenen (oc) DNA durch Abzählen der Topoisomerbanden ermittelt. Um die Superhelixdichte  $\sigma$  nach Gleichung 1.4 zu berechnen, wurden die Verbindungsdifferenzen der Topoisomere mit den stärksten Banden gemittelt. Tabelle 3.2 können die  $\Delta Lk$ -Werte und die abgeleiteten mittleren Superhelixdichten der Plasmide entnommen werden. Es wurde eine für native superhelikale DNA typische Superhelixdichte beobachtet, die nur bei pUC18-4A-H1/2-E gegenüber den übrigen etwas geringer ausfiel.



**Abb. 3.3** Chloroquingel zur Bestimmung der Superhelixdichte der aufgereinigten DNA

Das gezeigte Agarosegel und der Elektrophoresepuffer enthielten  $1\mu\text{g/ml}$  Chloroquin. Mit der auf diesem Gel nicht aufgetragenen Probe (pUC18-5/6A-H1/4-I/E, vgl. Tab. 3.2) wurde entsprechend verfahren. Der verwendete Topoisomerstandard entspricht pUC18-DNA, dessen Größe (2.7 kb) sich leicht von der Proben-DNA unterscheidet, wie an der Bande der ringoffenen (oc) DNA zu erkennen ist. Für den Topoisomerstandard sind in jeder Spur die zugehörigen  $\Delta Lk$ -Werte angegeben, die sich jeweils auf die stärksten Banden beziehen.

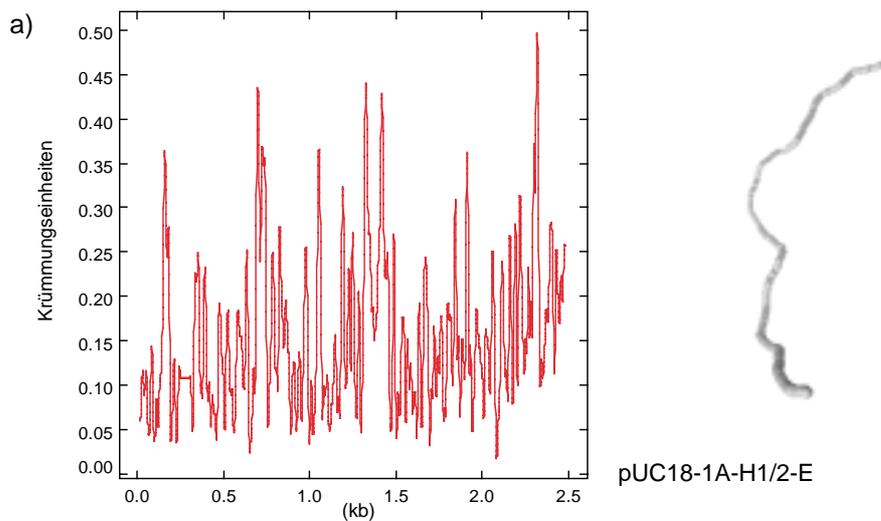
**Tab. 3.2** Verbindungsdifferenzen und Superhelixdichten der untersuchten Plasmide

Plasmid	Länge [bp]	Verbindungsdifferenzen $\Delta Lk$	mittlere Superhelixdichte $\sigma$
pUC18-5/6A-H1/4-I/E	2571	-13/-14/-15	-0.057
pUC18-5/6A-H1/4-E	2521	-13/-14/-15	-0.058
pUC18-5/6A-H1/2-E	2522	-13/-14	-0.056
pUC18-4A-H1/2-E	2535	-10/-11/-12	-0.045
pUC18-1A-H1/2-E	2497	-13/-14	-0.057

### 3. 1. 4 Krümmungsanalyse

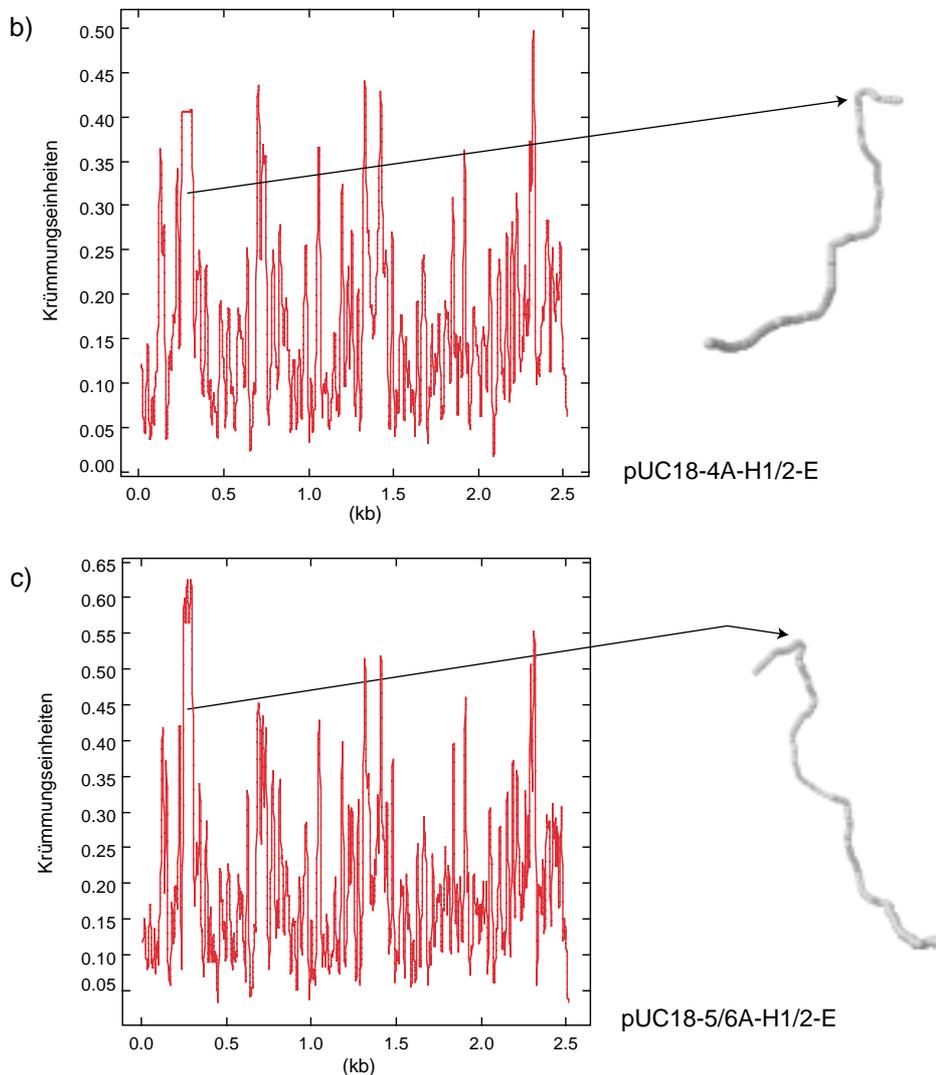
Mit dem Programm *Curvature* wurde die Gesamtsequenz der Plasmide nach dem Modell von Bolshoy *et al.* (1991) auf intrinsische Krümmung untersucht (siehe 2.6.2). Mit dem Programm wurde ein Krümmungsprofil erstellt und es wurde die sich daraus ergebende Konformation der DNA graphisch dargestellt (Abb. 3.4). Der Anfang der Krümmungsdiagramme sowie das obere Ende der graphisch gezeigten Moleküle entsprechen der Nukleotidposition 1 (vgl. Plas-

midkarten im Anhang). Die repetitiven A-Blöcke innerhalb der *ClaI*-Insertionen befinden sich in pUC18-4A-H1/2-E zwischen den Positionen 247 und 320, in allen Plasmiden des A<sub>5-6</sub>-Typs zwischen den Positionen 145 und 307. In den Plasmiden wird eine starke Krümmung für diese Bereiche durch die Krümmungsanalyse vorhergesagt. Das Kontrollplasmid pUC18-1A-H1/2-E ist innerhalb der *ClaI*-Insertion ungekrümmt. Die Gesamtsequenz weist in allen Plasmiden weitere schwächere Krümmungen auf, wobei in den Bereichen um die Positionen 700 bzw. 1400 die auffälligsten natürlichen Krümmungen vorliegen. Die Nukleotidsequenz ist in diesen Bereichen ebenfalls durch mehrere Adeninblöcke gekennzeichnet. Diese sind allerdings von unregelmäßiger Länge und nicht in helikaler Phase angeordnet und verursachen deshalb vermutlich eine schwächere Krümmung als die *ClaI*-Insertionen in den Plasmiden des A<sub>4</sub>- und des A<sub>5-6</sub>-Typs.



**Abb. 3.4** Krümmungsprofile der untersuchten Plasmide

a) pUC18-1A-H1/2-E, nächste Seite: b) pUC18-4A-H1/2-E und c) pUC18-5/6A-H1/2-E, repräsentativ für alle Plasmide des A<sub>5-6</sub>-Typs. Für jedes Plasmid ist jeweils das Krümmungsdiagramm und die dazu gehörige graphische Darstellung des Krümmungsprofils gezeigt. Die Moleküle sind jeweils unterschiedlich gedreht, um die Krümmung der *ClaI*-Insertionen hervorzuheben. Durch die Pfeile ist auf diese Krümmungen verwiesen.



Fortsetzung von Abb. 3.4

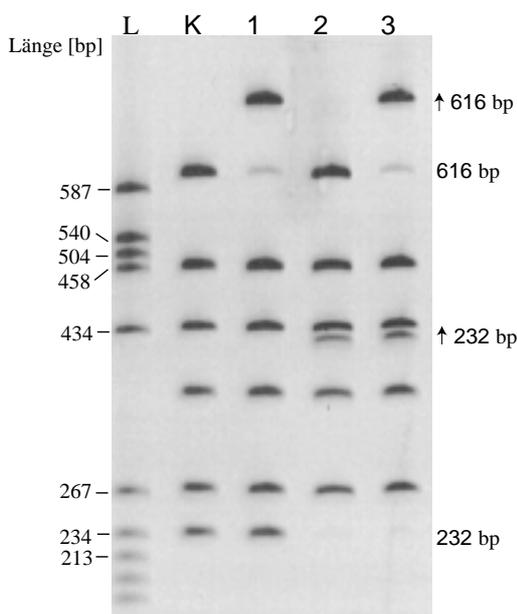
## 3.2 Markierte DNA

### 3.2.1 Sequenzspezifische Biotinylierung

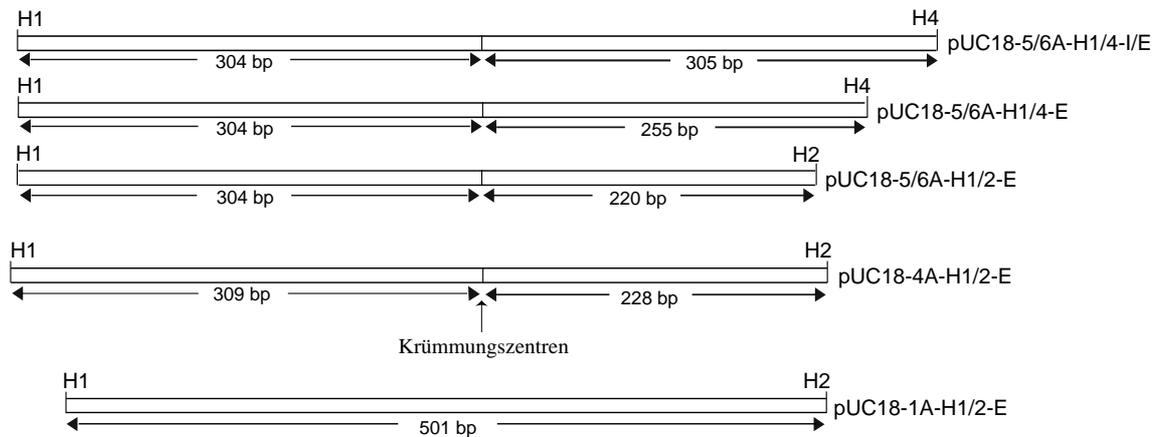
Es wurde bereits gezeigt, dass über triplexbildende Oligonukleotide (TFOs) eine hohe Ausbeute an sequenzspezifisch biotinylierter scDNA erhalten werden kann (Pfannschmidt *et al.*, 1996; Pfannschmidt & Langowski, 1998). Die Erkennungssequenzen und die dazu komplementären TFOs müssen dazu eine ausreichende Länge besitzen. In der vorliegenden Arbeit enthielten die Plasmide nach den durchgeführten H2- und H4-Klonierungen zwei verschiedene

*pu•py*-Erkennungssequenzen (H1 und H2 bzw. H1 und H4, vgl. Klonierungsschemata in Abb. 1.1 und 1.2), so dass die Bindungsspezifität für alle Positionen untersucht werden musste.

Die Anbindung der TFOs an die Erkennungssequenzen (siehe 2.3.5) kann nach Restriktionspaltung der Triplex-DNA mit dem Enzym *Hae*III anhand einer charakteristischen Bandenverschiebung in einem Polyacrylamidgel nachgewiesen und quantifiziert werden. Abbildung 3.5 zeigt die Bandenverschiebung aufgrund der Hybridisierung der TFOs 3 und 4 an die *pu•py*-Sequenzen H1 und H2 im Plasmid pUC18-5/6A-H1/2-E. Es wurden zwei Markierungsansätze mit je einem der TFOs und ein Ansatz mit beiden TFOs hergestellt, um zu untersuchen, ob beide TFOs an die jeweilige Erkennungssequenz spezifisch binden. Mit dem Plasmid pUC18-5/6A-H1/4-E wurde genauso verfahren, um die Bindung der TFOs 3 und 6 an die *pu•py*-Sequenzen H1 und H4 zu untersuchen. Anhand der Gele war erkennbar, dass die Inkubation mit einem TFO ausschließlich eine Bandenverschiebung des Fragments bewirkte, welches die dazu gehörige Erkennungssequenz enthielt. Die Markierungsrate betrug aufgrund der Quantifizierung mit dem Programm BioImage (siehe 2.6.1) in diesem Versuch >90 % an jeder TFO-Bindungsstelle. Bei Zugabe beider TFOs war die Markierungseffizienz pro Erkennungssequenz ebenso hoch wie bei einer Einzelmarkierung. In den meisten im Laufe der Arbeit durchgeführten Markierungsansätzen wurde eine Effizienz von ca. 70-95% pro Biotinylierungsposition erzielt. Dies entsprach rechnerisch einem Anteil an effektiv doppelt-markierter DNA von 49-90 %.



**Abb. 3.5** Elektrophoretischer Nachweis der sequenzspezifischen TFO-Anbindung  
Gezeigt ist die Bindung der TFOs 3 und 4 an die *pu•py*-Sequenzen H1 und H2 im Plasmid pUC18-5/6A-H1/2-E. Nach der TFO-Anbindung und UV-crosslinking (siehe 2.3.5) wurde die DNA mit dem Enzym *Hae*III geschnitten und auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Sequenz H1 ist im 616 bp-Fragment, die Sequenz H2 im 232 bp-Fragment lokalisiert. Das Gel zeigt neben der unmarkierten Kontrolle (K) drei Markierungsansätze, in denen TFO 3 (1), TFO 4 (2) sowie TFOs 3 und 4 (3) zugegeben wurden. L: Längenstandard.



**Abb. 3.6** Biotinylierungspositionen in Relation zur Krümmungsinserion

Die angegebenen Längen beziehen sich jeweils auf die an die *pu•py*-Sequenz am 5'-Ende direkt angrenzende Base.

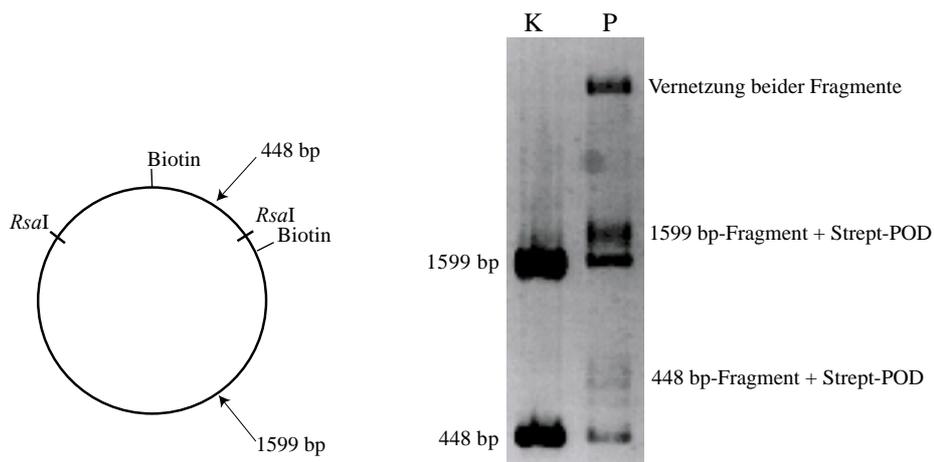
Alle mit der biotinylierten DNA durchgeführten Untersuchungen erfolgten bei nahe neutralem pH-Wert (7.2-8.0). Wie unter 1.3 beschrieben, ist unter diesen Bedingungen ein DNA-Triplex zwischen Pyrimidin- und Purinbasen nicht stabil, so dass die TFOs nur über das Psoralen mit der Plasmid-DNA verknüpft sind. Die exakten Biotinylierungspositionen in den Plasmiden entsprechen damit diesen Verknüpfungsstellen. Dies sind die an die *pu•py*-Sequenzen angrenzenden TATA-Sequenzen, deren Positionen mittels Sequenzierungen festgestellt wurden (Abb. 2.3 und Tab. 3.1). Da nicht genau bestimmt werden konnte, mit welcher Base innerhalb der TATA-Sequenz das Psoralen verbunden ist, wurde die an die *pu•py*-Sequenz direkt angrenzende Base als Markerposition definiert. Die sich daraus ergebenden Distanzen der Marker in Relation zur Krümmungsinserion sind in Abb. 3.6 dargestellt.

### 3. 2. 2 Reaktionsprodukte zwischen biotinylierter DNA und Strept-POD

#### Gelelektrophoretische Darstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine quantitative Charakterisierung der Vernetzungsreaktion zwischen zwei an die scDNA angefügte Biotine über ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat (Strept-POD). Eine intramolekulare Vernetzung kann angenommen werden, weil Streptavidin insgesamt vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von zweifach biotinylierter scDNA mit gebundenem Strept-POD legten bereits das Auftreten einer Vernetzung nahe (Pfannschmidt, 1998): Mit großer Häufigkeit befand sich auf den SFM-Bildern ein Strept-POD auf einem superhelikalen Überkreuzungspunkt, der einer

Endschleife benachbart war. Dabei stimmten die Längen der Endschleifen gut mit dem Abstand beider Biotinylierungspositionen im Plasmid überein, womit offenbar der Überkreuzungspunkt einer Vernetzung der Biotine entsprach. Hier war es erforderlich, das Auftreten der Vernetzung, wie auch aller anderen möglichen Reaktionsprodukte, direkt nachweisen und darstellen zu können.



**Abb. 3.7** Gelelektrophoretischer Nachweis der intramolekularen Quervernetzung

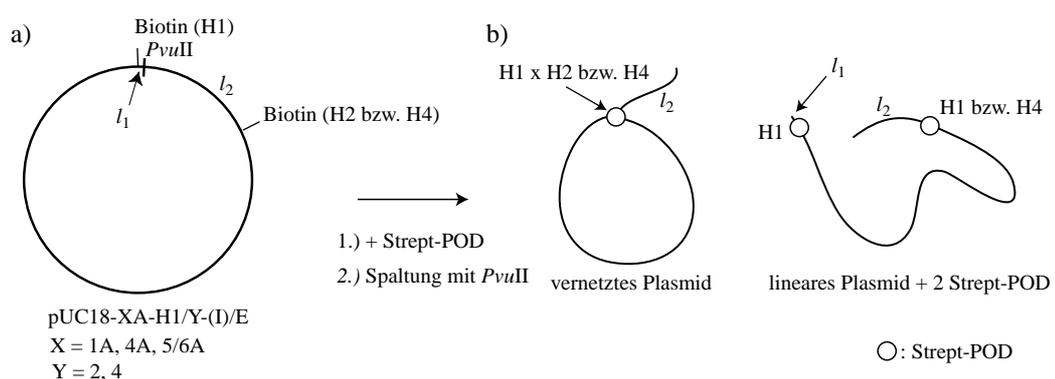
Links: Positionen der *RsaI*-Schnittstellen und der Biotinmarker in den Plasmiden. Rechts: Auf das 1 %ige Agarosegel wurde mit *RsaI* gespaltene DNA (hier pUC 18-1A-H1/2-E) ohne Strept-POD (K) und mit Strept-POD (P) aufgetragen. Die am langsamsten wandernde Bande entspricht der Vernetzung beider *RsaI*-Fragmente.

Zunächst wurden die Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch dargestellt (Abb. 3.7). In einem Bindungsansatz (siehe 2.3.7) wurde zweifach biotinylierte scDNA mit Strept-POD versetzt und danach mit dem Restriktionsenzym *RsaI* gespalten. *RsaI* erzeugt zwei Fragmente, die jeweils eine Biotinylierungsstelle enthalten. Um nachweisen zu können, dass die zu beobachtende Vernetzung im superhelikalen Plasmid auftrat, wurde kurz vor der Restriktionsspaltung Biotin im Überschuss zugesetzt. Damit waren alle freien Biotinbindungsstellen des Strept-POD abgesättigt, so dass keine weitere Vernetzung der Spaltprodukte stattfinden konnte. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleich wurde eine mit *RsaI* gespaltene DNA, die nicht mit Strept-POD inkubiert war, mit auf das Gel aufgetragen. Gegenüber beiden ungebundenen Fragmenten wurde ein deutlich langsamer wanderndes Fragment beobachtet, dessen Größe etwa der Summe beider *RsaI*-Spaltprodukte entsprach. Dies war nur durch eine Vernetzung der Fragmente über Strept-POD erklärbar, da die Kontrolle zeigte, dass die DNA vollständig durch das Restriktionsenzym

gespalten war. Weitere Banden wanderten etwas langsamer als die jeweiligen ungebundenen Fragmente. Diese Verzögerung beruhte auf der Bindung von Strept-POD ohne Vernetzung und konnte von zweifach und von einfach biotinylierten Plasmiden stammen. Es ist auf dem Gel erkennbar, dass die Bindung von Strept-POD an das 448 bp-Fragment mehrere Banden hervorrief. Die Bindung an das längere Fragment erzeugte eine verschmierte Bande. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass in der Strept-POD-Stammlösung Protein-Konjugate vorliegen können, in denen Streptavidin mit zwei, einer oder keiner Peroxidase verknüpft ist. Vom Hersteller (Pierce, Rockford, USA) wurde diese Beobachtung bestätigt.

### Rasterkraftmikroskopische Darstellung

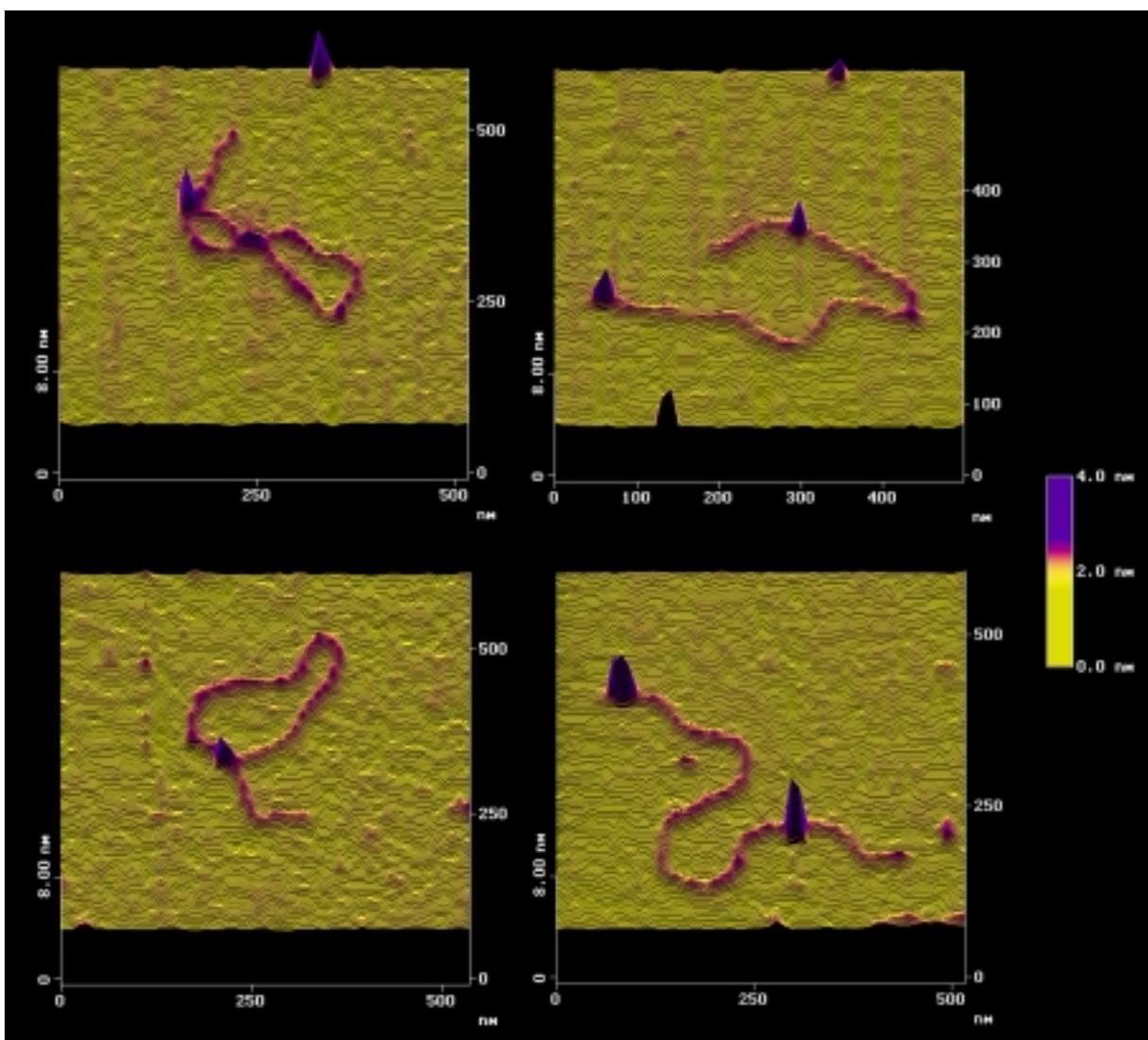
Die gelelektrophoretisch beobachtete Vernetzung wurde rasterkraftmikroskopisch bestätigt, um alle Reaktionsprodukte in einem Strept-POD-Bindungsansatz und die sequenzspezifische Markierung der DNA weiter zu überprüfen. Die mit Strept-POD inkubierte DNA wurde mit dem Enzym *PvuII* linearisiert, das eine Einzelschnittstelle in den untersuchten Plasmiden besitzt. Die Position der *PvuII*-Schnittstelle in Relation zu den Biotinylierungspositionen kann Abb. 3.8 entnommen werden. Es sind außerdem die nach der Restriktionsspaltung zu erwartenden Strukturen für zweifach biotinylierte Plasmide dargestellt. Die Enden der linearisierten DNA, d. h. die *PvuII*-Schnittstelle, wurden als Referenzpunkte für Längenmessungen zur Überprüfung der sequenzspezifischen Bindung des Proteins herangezogen.



**Abb. 3.8** Strategie zur Detektion der Reaktionsprodukte zwischen zweifach biotinylierter DNA und Strept-POD auf SFM-Bildern

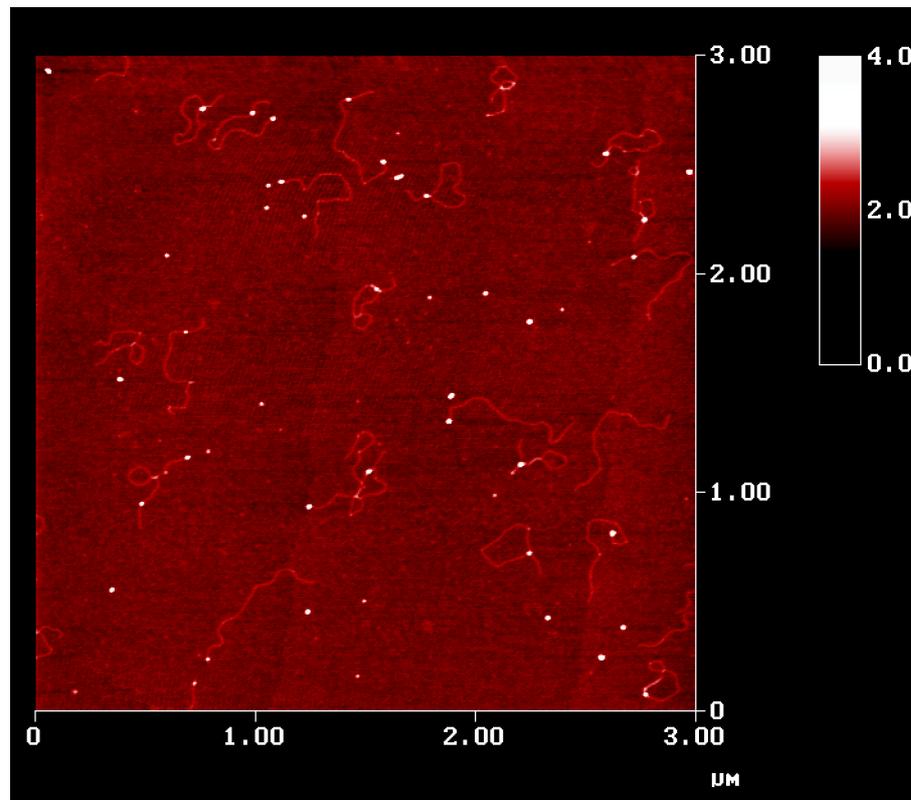
a) Position der *PvuII*-Schnittstelle und der Biotinylierungsstellen in den Plasmiden. b) zu erwartende Strukturen nach Inkubation mit Strept-POD und *PvuII*-Spaltung.  $l_1$  und  $l_2$  geben die Konturlängen der DNA-Bereiche zwischen einer Biotinylierungsposition und DNA-Ende an. Die Biotinylierungsposition entspricht dem TFO-Verknüpfungspunkt über Psoralen.

Die gesplattene DNA wurde in Luft nach dem unter 2.5.2 angegebenen Protokoll mikroskopiert. Zur Bindung der DNA auf den Glimmer wurde hier der Puffer D1 verwendet. Auf den SFM-Bildern war das Strept-POD deutlich erkennbar, und es wurden die in Abb. 3.8 gezeigten vermuteten Strukturen gefunden. Abbildung 3.9 zeigt entsprechende SFM-Aufnahmen einzelner Moleküle von pUC18-5/6A-H1/2-E und pUC18-5/6A-H1/4-I/E. Abbildung 3.10 zeigt eine  $3\ \mu\text{m}^2$ -Aufnahme, auf der alle in einem Bindungsansatz gefundenen Komplexe, einschließlich der Reaktionsprodukte aus den einfach biotinylierten Plasmiden, erkennbar sind.



**Abb. 3.9** SFM-Aufnahmen einzelner Plasmid-Moleküle mit gebundenem Strept-POD

Gezeigt sind pUC18-5/6A-H1/2-E (oben) und pUC18-5/6A-H1/4-I/E (unten). Die zweifach biotinylierte DNA wurde mit Strept-POD inkubiert und danach mit dem Enzym *PvuII* linearisiert. Die Strept-PODs sind als Kegel deutlich sichtbar. Das jeweils links abgebildete Plasmid zeigt wegen der Vernetzung der Biotine über ein Strept-POD eine ringförmige Struktur. Das jeweils rechte Plasmid trägt an beiden Biotinen Strept-POD. Über die Farbskala sind die Höhenunterschiede der Probenoberfläche kodiert.



**Abb. 3.10**  $3 \mu\text{m}^2$ -SFM-Aufnahme von pUC18-5/6A-H1/2-E mit gebundenem Strept-POD  
 Auf diesem Bild sind alle in einem Strept-POD-Bindungsansatz gebildeten Strukturen erkennbar: Außer den zweifach biotinylierten Plasmiden, die zwei Strept-PODs gebunden haben oder intramolekular vernetzt sind, sind die einfach biotinylierten Plasmide mit einem Strept-POD an einer der beiden Markerpositionen und die nicht biotinylierten Plasmide ohne Strept-POD zu erkennen.

Die mikroskopierten Plasmide pUC18-5/6A-H1/4-I/E und pUC18-5/6A-H1/4-I/E enthalten insgesamt alle zu überprüfenden *pu•py*-Erkennungssequenzen. Da die TFOs bei den vorliegenden Pufferbedingungen nur über das Psoralen mit der Plasmid-DNA verknüpft sind, kann die Position eines Strept-POD auf der DNA innerhalb eines bestimmten Intervalls um den Verknüpfungspunkt variieren. Um die Bindungsspezifität und damit auch die Reaktionsprodukte mit Sicherheit nachweisen zu können, mussten zunächst die Abweichungsgrenzen sinnvoll abgeschätzt werden. Dazu waren mehrere Faktoren zu berücksichtigen:

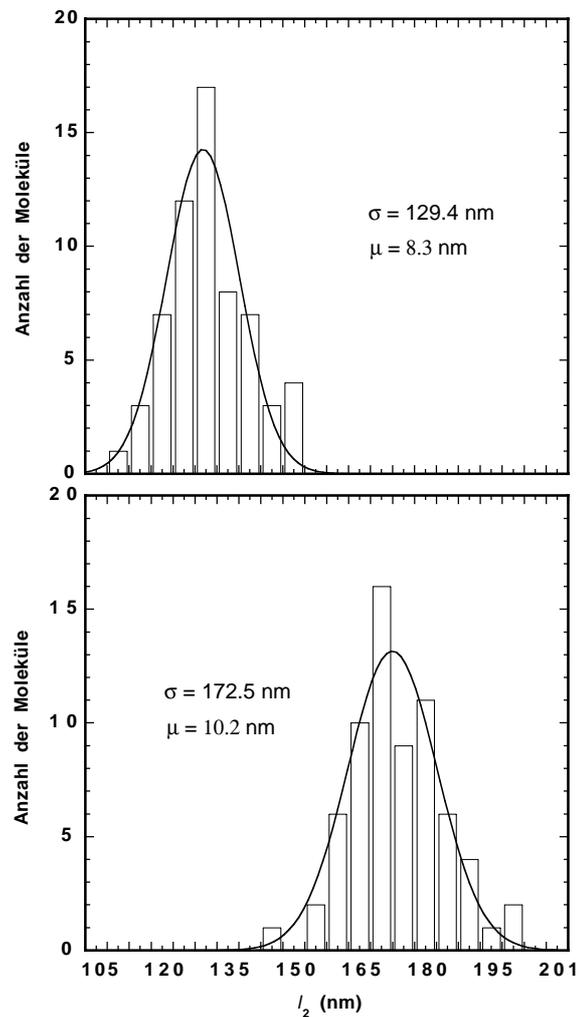
**1.) Die Länge der TFOs:** Unter Zugrundelegung einer Konturlänge einzelsträngiger DNA von  $0.6 \text{ nm}$  pro Nukleotid (Rivetti *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 1999) betragen die Längen der TFOs  $15.0 \text{ nm}$  (TFO 6, 25 Nukleotidreste) und  $16.2 \text{ nm}$  (TFOs 3 und 4, 27 Nukleotidreste).

**2.) Der Radius von Strept-POD auf SFM-Bildern:** Die Messung von 40 Strept-PODs ergab einen Radius von  $14.6 \text{ nm}$  (Durchmesser:  $29.2 \text{ nm} (\pm 5.3 \text{ nm})$ ).

**3.) Die Konturlänge der DNA auf SFM-Bildern:** Auf Glimmer gebundene DNA kann in der Konturlänge variieren. Messungen der Gesamtlänge der linearen Plasmide (siehe Tab. 3.3) lieferten Standardabweichungen von 21.3 nm (pUC18-5/6A-H1/4-I/E) und 19.1 nm (pUC18-5/6A-H1/2-E). Die sich daraus ergebenden prozentualen Abweichungen (2.6 % und 2.5 %) stimmen gut mit der im SFM bestimmten Längenabweichung eines 1868 bp großen Plasmids von 1.9 % überein (Rippe *et al.*, 1997b). Es sind deshalb Konturlängenabweichungen für den DNA-Abschnitt  $l_2$  von 4.2 nm in pUC18-5/6A-H1/4-I/E und 3.3 nm in pUC18-5/6A-H1/2-E zu erwarten (Der Bereich  $l_1$  wurde nicht ausgewertet, s. unten).

Über diese Werte kann die theoretisch größte Abweichung von der zu erwartenden Länge  $l_2$  abgeschätzt werden. Sie beträgt rechnerisch 33.8 nm für pUC18-5/6A-H1/4-I/E und 34.1 nm für pUC18-5/6A-H1/2-E. Die Messungen wurden an 72 Molekülen von pUC18-5/6A-H1/4-I/E und 63 Molekülen von pUC18-5/6A-H1/2-E anhand von Aufsicht-Bildern mit dem Programm Image SXM (Version 1.62) vorgenommen. Für die direkt am DNA-Ende lokalisierten Strept-PODs (an der Erkennungssequenz H1) war keine Distanzmessung möglich, da das Strept-POD den DNA-Endbereich  $l_1$  in fast allen Fällen überdeckte. Dieser Bereich besitzt unter der Annahme einer Konturlänge doppelsträngiger DNA von 0.33 nm/Basenpaar eine Länge von  $l_1 = 32.7$  nm (98 bp). Ein an die Biotinylierungsposition H1 gebundenes Strept-POD kann damit als spezifisch gebunden identifiziert werden, wenn es an einem DNA-Ende lokalisiert ist. Die Messungen der Länge  $l_2$  erfolgten ausgehend vom Mittelpunkt der Strept-PODs. Die Ergebnisse der Messungen können Tab. 3.3 und den Histogrammen in Abb. 3.11 entnommen werden. Die durchschnittliche Gesamtlänge der Plasmide war geringer als aus der Sequenz zu erwarten war (s. Tab 3.3). Für die erwartete Länge  $l_2$  ist deshalb ein um die prozentuale Abweichung der Gesamtlänge korrigierter Wert angegeben. Die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Längen ließ sich an eine Gaussfunktion anpassen. Der Mittelwert wich nur leicht von der korrigierten erwarteten Distanz ab. Diese lag bei pUC18-5/6A-H1/2-E innerhalb und bei pUC18-5/6A-H1/4-I/E nur um 0.2 nm außerhalb der gemessenen Standardabweichung. Weiterhin überstieg die Standardabweichung nicht die erwarteten Abweichungsgrenzen um den TFO-Verknüpfungspunkt. Die Breite der Verteilungen stimmte mit diesen Grenzen gut überein

**Abb. 3.11** Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Distanzen  $l_2$   
 Oben: pUC18-5/6A-H1/2-E; unten: pUC18-5/6A-H1/4-I/E. Die Zahlenwerte der x-Achsenbeschriftung bezeichnen die jeweils obere Klassengrenze. Die Verteilungen der Häufigkeiten entsprechen einer Gaussfunktion, was durch Anpassung mit dem Programm Kaleidagraph™ gezeigt wurde.



**Tab. 3.3** Distanzen  $l_2$  zwischen gebundenem Strept-POD und der *PvuII*-Schnittstelle

Plasmid	Gesamtlänge: erwartet (nm) gemessen (nm)	erwartete Distanz $l_2$ (nm)	korrigierte erwartete Distanz $l_2$ (nm)	gemessene Distanz $l_2$ (nm)
pUC18-5/6A-H1/2-E	840.7 $784.5 \pm 19.1$	143.0	133.5	$129.4 \pm 8.3$
pUC18-5/6A-H1/4-I/E	857.0 $814.0 \pm 21.3$	170.7	162.1	$172.5 \pm 10.2$

Alle erwarteten Längen ergeben sich aus den DNA-Sequenzen der Plasmide unter der Annahme einer Konturlänge der DNA von 0.33 nm/Basenpaar. Die Mittelwerte der gemessenen Längen und die Standardabweichungen wurden durch die Anpassung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte an eine Gaussfunktion ermittelt (s. Abb. 3.11).

Diese Messungen und der gelelektrophoretische Nachweis (siehe oben) belegen das Auftreten der intramolekularen Vernetzung in scDNA. Ein Strept-POD kann auf SFM-Bildern als spezifisch gebunden identifiziert werden, wenn es in einem Längenintervall von etwa 60 nm um den Verknüpfungspunkt lokalisiert ist. Damit können alle in einem Strept-POD-Bindungsansatz gebildeten Reaktionsprodukte eindeutig zugeordnet werden. Die effektiv doppelt biotinylierten Plasmide sind von den nur einfach oder nicht markierten Plasmiden unterscheidbar. Eine gelelektrophoretische Darstellung erlaubt diese Unterscheidung nicht, weil hierbei die DNA in mindestens zwei Fragmente gespalten werden muss. Die Längenmessungen bestätigten weiterhin die sequenzspezifische Biotinylierung an allen TFO-Erkennungssequenzen.

### 3. 2. 3 Berechnung des Reaktionsradius

Wie unter 1.2.1 beschrieben bezieht sich die lokale Konzentration  $j_M$  bei numerischen Berechnungen auf einen bestimmten Reaktionsradius  $r$  (Vologodskii *et al.*, 1992; Rippe *et al.*, 1995). Für die Vernetzungsreaktion musste daher der Reaktionsradius bestimmt werden, um Vergleiche zu den theoretischen Berechnungen zu gewährleisten. Bei den Messungen der Positionen der an die DNA gebundenen Strept-PODs auf SFM-Bildern zeigte sich die freie Beweglichkeit der TFOs um die Verknüpfungsstelle bei nahe neutralem pH-Wert (3.2.2). Der Reaktionsradius kann deshalb aus dem mittleren End-zu-Endabstand  $\langle R \rangle$  der TFOs angenähert werden. Dazu wurde Gleichung 2.6 (siehe 2.6.3) verwendet, wobei das TFO als statistische Kette angesehen wurde. Nach Untersuchungen von Rivetti *et al.* (1998) und Mills *et al.* (1999) liegt die Persistenzlänge von einzelsträngiger DNA im Bereich von 2.0 nm (dies entspricht einer statistischen Segmentlänge von  $l = 4.0$  nm).  $\langle R \rangle$  beträgt damit 7.7 nm für TFO 6 (25 Nukleotidreste) und 8.0 nm für die TFOs 3 und 4 (27 Nukleotidreste). Damit ergibt sich ein mittlerer Reaktionsradius  $r$  zwischen den TFO-Verknüpfungspositionen in der DNA von  $2 \cdot \langle R \rangle \sim 16$  nm. Es ist allerdings zu bedenken, dass verschiedene Faktoren, wie z. B. die Nukleotidzusammensetzung oder Salzbedingungen die Persistenzlänge beeinflussen können, so dass diese Berechnung als Näherung anzusehen ist. Das initial gebundene Streptavidin sollte zum Reaktionsradius ebenfalls beitragen. Mit dem Programm Sedenterp wurde ein Durchmesser des hydratisierten Streptavidins von 5.8 nm ermittelt (siehe 2.6.4). Da jedoch wegen der freien Beweglichkeit der TFOs keine bestimmte Orientierung des Proteins besteht und weiterhin nicht festgelegt ist, welche der vier Biotinbindungsstellen an der Vernetzung beteiligt sind, ist

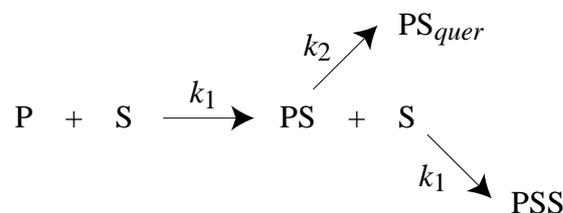
eine genaue Abschätzung des Beitrags des Proteins zum Reaktionsradius nicht sinnvoll. Es wurde deshalb ein mittlerer Reaktionsradius  $r$  von 15-20 nm angenommen.

### 3.3 Berechnungen von Reaktionskinetiken

#### 3.3.1 Analyse einer Kompetitionsreaktion

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die bei der Bindung von Strept-POD an zweifach biotinylierte DNA gebildeten Reaktionsprodukte nachgewiesen und dargestellt. Im Folgenden wird der Reaktionsmechanismus für die Bildung dieser Reaktionsprodukte gezeigt und es wird ein kinetisches Modell beschrieben, das eine quantitative Charakterisierung der Vernetzungsreaktion ermöglicht. Das Ziel bei der Formulierung eines Modells war es, die Reaktionskonstante der Vernetzungsreaktion und die lokale Konzentration  $j_M$  einer biotinylierten Stelle in der Umgebung der anderen zu bestimmen.

Die Inkubation von zweifach biotinylierter Plasmid-DNA (P) mit Strept-POD (S) führt in einem ersten Reaktionsschritt zu einem Intermediärprodukt, in dem zunächst ein Strept-POD an ein Biotin gebunden ist (PS). Im zweiten Reaktionsschritt konkurriert dieses gebundene Strept-POD mit noch ungebundenem Strept-POD um das zweite Biotin, so dass kompetitiv intramolekular vernetzte Plasmide ( $PS_{quer}$ ) und Plasmide mit zwei gebundenen Strept-PODs (PSS) entstehen. Der Biotin-Streptavidinkomplex besitzt eine Dissoziationskonstante  $K_D = 10^{-14}$  M, womit die Reaktion als irreversibel anzusehen ist. Deswegen werden nur die Hinreaktionen berücksichtigt und der Reaktionsmechanismus kann folgendermaßen zusammengefasst werden:



$k_1$  ist die Reaktionskonstante der Bindung von frei in Lösung befindlichem Strept-POD an eine biotinylierte Stelle in der DNA und  $k_2$  ist die Reaktionskonstante der intramolekularen Vernetzung.

Der Abbau des Eduktes P unter Bildung des Intermediärproduktes PS entspricht einer Reaktion zweiter Ordnung, da dies eine bimolekulare Reaktion ist, bei der die Konzentrationen beider Reaktionspartner P und S geschwindigkeitsbestimmend sind. Daher kann der zeitliche Konzentrationsverlauf des Eduktes P entsprechend Gleichung 3.1 formuliert werden. Es muss berücksichtigt werden, dass die DNA in diesem Reaktionsschritt zwei Biotine trägt:

$$\frac{d[P]}{dt} = -k_1[P][S] \cdot 2. \quad (3.1)$$

Das Intermediärprodukt PS reagiert sofort weiter zu den Produkten  $PS_{quer}$  und PSS. Die Bildung von PSS ist wiederum eine Reaktion zweiter Ordnung, während die Bildung von  $PS_{quer}$  eine monomolekulare Reaktion ist und darum nach erster Ordnung verläuft (entsprechend Gleichung 1.5). Die Voraussetzung für diesen Reaktionstyp ist erfüllt, weil das Intermediärprodukt PS ein aktivierter Zustand für die Bildung der intramolekularen Vernetzung ist. Der Konzentrationsverlauf des Intermediärproduktes PS in der Gesamtreaktion ergibt sich darum nach

$$\frac{d[PS]}{dt} = k_1[P][S] \cdot 2 - k_1[PS][S] - k_2[PS]. \quad (3.2)$$

Die Entstehung der Endprodukte PSS und  $PS_{quer}$  lassen sich getrennt berechnen:

$$\frac{d[PSS]}{dt} = k_1[PS][S] \quad (3.3)$$

und

$$\frac{d[PS_{quer}]}{dt} = k_2[PS]. \quad (3.4)$$

Im Folgenden wird vorausgesetzt, dass  $[S] \gg [P]$ . In diesem Fall kann  $[S]$  als annähernd konstant angesehen werden und ist damit zu jedem Zeitpunkt gleich der Anfangskonzentration  $[S]_0$ . Division von Gleichung 3.3 durch Gleichung 3.4 ergibt dann die zeitunabhängige Beziehung

$$\frac{d[PS_{quer}]}{d[PSS]} = \frac{k_2}{k_1[S]_0}. \quad (3.5)$$

Trennung der Variablen in Gleichung 3.5 und Integration bei  $[\text{PS}_{\text{quer}}] = 0$  und  $[\text{PSS}] = 0$  ergibt

$$d[\text{PS}_{\text{quer}}] = \frac{k_2}{k_1[\text{S}]_0} \cdot d[\text{PSS}] \quad (3.6)$$

Daraus erhält man

$$\int_0^{[\text{PS}_{\text{quer}}]} d[\text{PS}_{\text{quer}}] = \frac{k_2}{k_1[\text{S}]_0} \cdot \int_0^{[\text{PSS}]} d[\text{PSS}] \quad (3.7)$$

und

$$[\text{PS}_{\text{quer}}] = \frac{k_2}{k_1[\text{S}]_0} \cdot [\text{PSS}] \quad (3.8)$$

$$\Rightarrow k_2 = \frac{[\text{PS}_{\text{quer}}][\text{S}]_0 k_1}{[\text{PSS}]} \quad (3.9)$$

Die lokale Konzentration  $j_M$  einer biotinylierten Position in der Umgebung der anderen kann ebenfalls berechnet werden. Hierbei wird die Vernetzungsreaktion als eine intramolekulare bimolekulare Reaktion betrachtet. Die intrinsische Konstante dieser Reaktion sollte gleich  $k_1$  sein. Es gilt dann

$$k_2 = k_1 \cdot j_M. \quad (3.10)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 3.9 in Gleichung 3.8 ergibt sich

$$j_M = \frac{[\text{PS}_{\text{quer}}][\text{S}]_0}{[\text{PSS}]} \quad (3.11)$$

Unter der strengen Voraussetzung, dass Strept-POD in einem molaren Überschuss über der DNA vorliegt, folgt aus den Gleichungen 3.9 und 3.11, dass das Verhältnis der Konzentrationen von  $\text{PS}_{\text{quer}}$  und PSS zu jedem Zeitpunkt gleich ist und von der Konzentration des eingesetzten Strept-POD abhängt. Experimentell können daher durch die Bestimmung dieses Verhältnisses aus Reaktionsansätzen, die sich im Gleichgewicht befinden,  $k_2$  und  $j_M$  ermittelt

werden. Die Richtigkeit des Modells kann durch Messungen bei verschiedenen Strept-POD-Konzentrationen kontrolliert werden.

### 3. 3. 2 Fehlerrechnung

Da die Reaktionsprodukte  $PS_{quer}$  und PSS eindeutig auf SFM-Bildern erkannt werden können, sollte es möglich sein, mittels Auszählungen das Verhältnis  $[PS_{quer}]/[PSS]$  zu bestimmen. Der Messwert ist dabei jedoch durch einen Stichprobenfehler behaftet, der wie folgt bestimmt werden kann:

Da der Wert  $P = [PS_{quer}]/[PSS]$  durch Zählen von zwei sich gegenseitig ausschließenden Alternativen ( $PS_{quer}$  oder PSS) beobachtet wird, ist die Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen eines bestimmten Zählergebnisses binominalverteilt. Die Streuung  $\sigma$  einer Binominalverteilung ist gegeben durch

$$\sigma = \sqrt{npq}, \quad (3.12)$$

wobei p und q die beobachteten relativen Häufigkeiten der Reaktionsprodukte  $PS_{quer}$  und PSS sind und n die Stichprobengröße ist.

Der mittlere Fehler  $\Delta P$  von P lässt sich anhand des berechneten  $\sigma$  nach dem Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz ermitteln (Kuchling, 1996):

$$\Delta P = \sqrt{\left(\frac{\sigma}{n_1}\right)^2 + \left(\frac{\sigma}{n_2}\right)^2} \cdot P. \quad (3.13)$$

$n_1$  und  $n_2$  sind jeweils die beobachteten Anzahlen der Reaktionsprodukte  $PS_{quer}$  und PSS.

### 3. 3. 3 Analyse von bimolekularen Reaktionen

Aus den Gleichungen 3.9 und 3.11 ist erkennbar, dass zur Berechnung von  $k_2$  aus Gleichung 3.9 die Reaktionskonstante  $k_1$  der Bindung von frei in Lösung befindlichem Strept-POD an biotinylierte DNA bekannt sein muss. Diese Konstante wurde im Quench-Flow-Gerät an einfach biotinylierter Plasmid-DNA  $P_e$  gemessen. Zuvor wurden Testreaktionen für das Instrument mittels der DNPA-Hydrolyse durchgeführt (siehe 2.4.1). Die Berechnung der Konstanten für diese Reaktionen wird im Folgenden dargestellt.

Beide Reaktionen folgen demselben bimolekularen Mechanismus und werden daher zur Berechnung der Reaktionskonstanten durch dieselbe kinetische Gleichung ausgedrückt. Es gilt deshalb die Reaktionsgleichung:



Dabei ist A jeweils das Edukt einfach biotinylierte DNA bzw. DNPA, R das Edukt Strept-POD bzw. OH<sup>-</sup> und B das Produkt DNA mit gebundenem Strept-POD bzw. DNP. Die Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen werden in diesem Abschnitt mit  $k$  bezeichnet. Es soll angenommen werden, dass  $[R] \gg [A]$ , so dass die Reaktionen nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung ablaufen. Dann gilt entsprechend der unter 1.4 aufgeführten Gleichung 1.7 für den Konzentrationsverlauf des Eduktes A folgendes Geschwindigkeitsgesetz für eine irreversible Reaktion:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{app}[A]. \quad (3.14)$$

Zur Berechnung der Reaktionskonstante muss Gleichung 3.14 umgeformt werden. Separierung der Variablen ergibt zunächst

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k_{app} dt. \quad (3.15)$$

Durch Integration erhält man

$$\int_{[A](0)}^{[A](T)} \frac{d[A]}{[A]} = -k_{app} \int_0^T dt \quad (3.16)$$

und

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_{app} t, \quad (3.17)$$

wobei  $[A]_0$  die Anfangskonzentration des Eduktes A ist. Die Abnahme der Konzentration von A als Funktion der Zeit wird also durch eine Exponentialfunktion beschrieben:

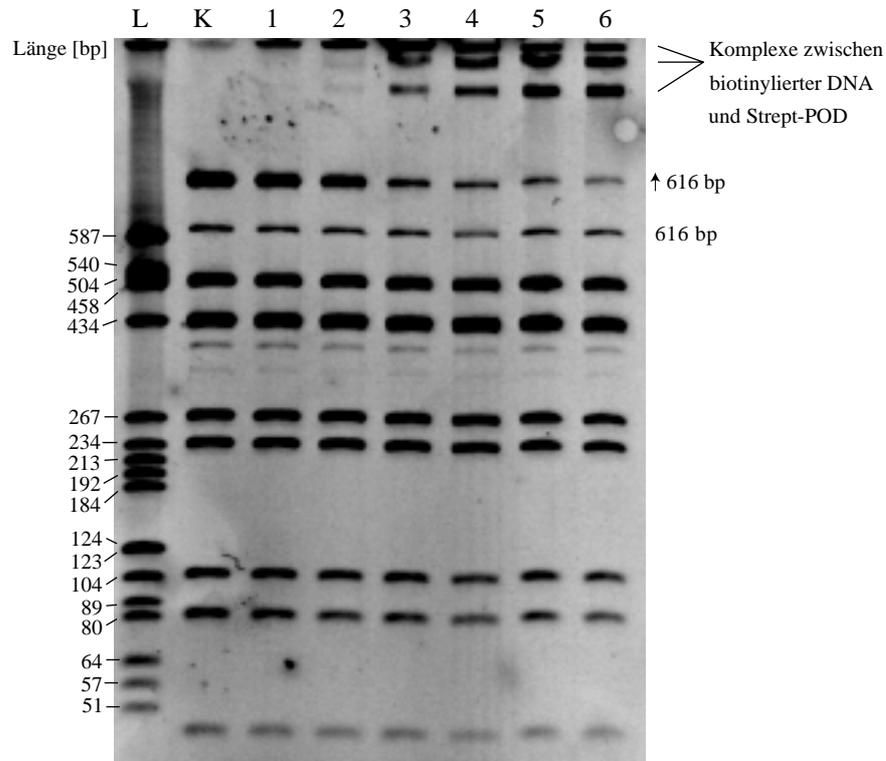
$$[A] = [A]_0 e^{-k_{app}t} . \quad (3.18)$$

Da für die Konzentration des Produkts B zu jedem Zeitpunkt  $[B] = [A]_0 - [A]$  gelten muss, ergibt sich für den zeitlichen Konzentrationsverlauf von B

$$[B] = [A]_0 (1 - e^{-k_{app}t}) . \quad (3.19)$$

### 3.4 Bindungsaktivität von Strept-POD

Die Konzentration von aktivem Strept-POD in der vorliegenden Stammlösung wurde durch Titrations von einfach biotinylierter DNA mit variierenden Mengen an Strept-POD untersucht. Die DNA (pUC18-5/6A-H1/2-E) wurde zunächst an der TFO-Erkennungsstelle H1 biotinyliert und anschließend mittels Gelfiltration von den ungebundenen TFOs getrennt (siehe 2.3.5 und 2.3.6). Für zwei unabhängige Titrations wurde die DNA aus einem Biotinylierungsansatz verwendet. Nach der Inkubation mit Strept-POD (2.3.8) wurde die DNA mit dem Enzym *HaeIII* gespalten. Wie bereits in Abb. 3.5 gezeigt, kann das an die Erkennungsstelle H1 gebundene TFO3 nach Auftrennung der *HaeIII*-Spaltprodukte in einem Polyacrylamidgel durch die Wanderungsverzögerung des 616 bp-Fragments nachgewiesen werden. Abbildung 3.12 zeigt das Polyacrylamidgel von einem Titrationsexperiment. Durch die Bindung des Strept-POD an die DNA wurde das mit dem TFO verknüpfte  $\uparrow$ 616 bp Fragment weiter verzögert. In Folge dessen verringerte sich die Intensität der  $\uparrow$ 616 bp-Bande. Dabei zeigte sich, dass auch bei starkem Überschuss von Strept-POD (Spuren 5 und 6 im abgebildeten Gel) nicht die gesamte mit TFO verknüpfte DNA gebunden war. Daraus ist zu schließen, dass ein Teil der TFOs inaktives oder kein Biotin enthielt. Wie im Agarosegel in Abb. 3.7 zeigten sich mehrere Banden der DNA-Strept-POD-Komplexe.

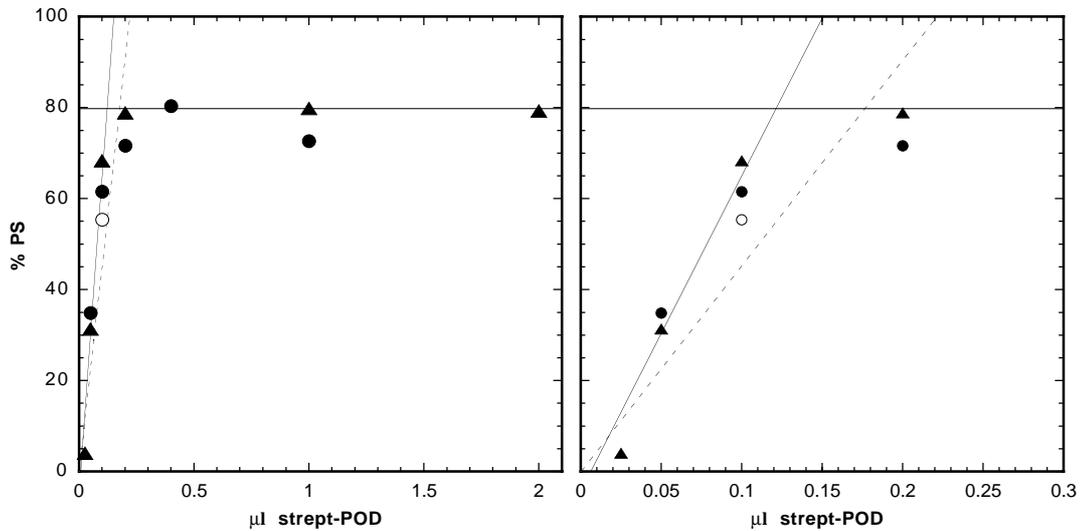


**Abb. 3.12** Polyacrylamidgelelektrophorese der mit Strept-POD titrierten biotinylierten DNA  
 Wegen der Bindung des Proteins erfolgt eine Wanderungsverzögerung des  $\uparrow 616$  bp-Fragments, dessen Bandenintensität sich deshalb verringert. K: Kontrolle ohne Strept-POD-Zugabe, Spuren 1-6: Titrationsproben mit 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 1.0 und 2.0  $\mu$ l der Strept-POD Stammlösung, L: Längenstandard.

Zur Auswertung der Titration wurde für jede Probe der prozentuale Anteil der mit Strept-POD gebundenen biotinylierten DNA bestimmt. Mit dem Programm BioImage (siehe 2.6.1) wurde zunächst das Verhältnis  $Q$  der Bandenintensität des  $\uparrow 616$  bp Fragments zur Intensität einer anderen Bande (z. B. der Bande der nicht mit TFOs verknüpften 616 bp Fragmente) für alle Proben und für eine mit auf das Gel aufgetragene Kontrolle bestimmt. Der Anteil an gebundener DNA ( $p$ ) wurde dann wie folgt errechnet:

$$p = 1 - \frac{Q_{\text{Probe}}}{Q_{\text{Kontrolle}}} \quad (3.20)$$

Die prozentualen Anteile wurden gegen das Volumen der zu den Titrationsproben gegebenen Strept-POD-Stammlösung graphisch aufgetragen (Abb. 3.13). Die Bindungskurve zeigt, dass die Menge an gebundener DNA zunächst linear in einem stöchiometrischen Verhältnis zur Strept-POD-Menge anstieg. Die Extrapolation dieses linearen Bereichs zum Plateau der Bindungskurve führt zum Äquivalenzpunkt, an dem theoretisch das Volumen der Strept-POD-Stammlösung abgelesen werden kann, das die zur vollständigen Bindung der biotinylierten DNA aktiven Bindungsstellen enthält. Das Plateau (bei 80 %) gab den Anteil der mit TFOs verknüpften DNA-Moleküle mit aktivem Biotin an. Der Anteil an TFO-Bindung betrug hier 86 %. Damit waren insgesamt 67 % der DNA effektiv biotinyliert, so dass jeder Titrationsansatz 0.41 pmol biotinylierte DNA enthielt. Da zu erwarten war, dass nicht alle Bindungsstellen mit biotinylierter DNA abgesättigt wurden (Sano *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996), musste weiterhin die Stöchiometrie der Bindung bestimmt werden. Deshalb wurde die DNA einer Probe des linear ansteigenden Bereichs mittels SFM sichtbar gemacht (s. 2.5.2). So wie intramolekular vernetzte Plasmide (Abb. 3.9) können auch intermolekular vernetzte Plasmide auf SFM-Bildern identifiziert werden. Die Zuordnung von 168 Komplexen ergab 55 % DNA-Moleküle, die an Strept-POD gebunden waren. Dies stimmt mit der elektrophoretisch bestimmten Menge für diese Probe von 62 % annähernd überein. Nur ein Teil der DNA-Moleküle war intermolekular über Strept-POD vernetzt; insgesamt wurden 37.6 % Monomere, 55.9 % Dimere, 6.5 % Trimere und 0 % Tetramere gefunden. Dies bestätigt, dass die vier Bindungsstellen des Streptavidins nicht vollständig mit biotinylierter DNA gesättigt werden. Aus dem ermittelten Verhältnis der Komplexe wurde dann die Menge an Strept-POD abgeleitet, die die gelelektrophoretisch beobachtete DNA-Menge gebunden hatte. Die Extrapolation dieser Menge zum Plateau der Kurve gab den korrigierten Äquivalenzpunkt bei 0.17  $\mu$ l der Strept-POD-Stammlösung an; die Konzentration an aktivem Strept-POD war damit 2.4  $\mu$ M.



**Abb. 3.13** Bindungskurve für einfach biotinylierte DNA und Strept-POD

Der prozentuale Anteil an gebundener DNA (%PS) ist gegen das Volumen an zugegebener Strept-POD Stammlösung aufgetragen. (▲) Messpunkte aufgrund des Gels in Abb 3.12, (●) zweite Titration, (○) aufgrund von SFM-Bildern beobachtete Bindung für eine Probe der zweiten Titration. Die Messpunkte im ansteigenden Bereich der Bindungskurve wurden an eine lineare Funktion angepasst (durchgezogene Linie). Die mittels der SFM-Bilder ermittelte Strept-POD-Menge pro gebundener DNA wurde extrapoliert, um den für die Stöchiometrie der Bindung korrigierten Titrationspunkt zu ermitteln (gestrichelte Linie). Links: Datenpunkte aller Bindungsansätze, rechts: Anfangsbereich der Bindungskurve.

## 3.5 Quench-Flow-Kinetiken

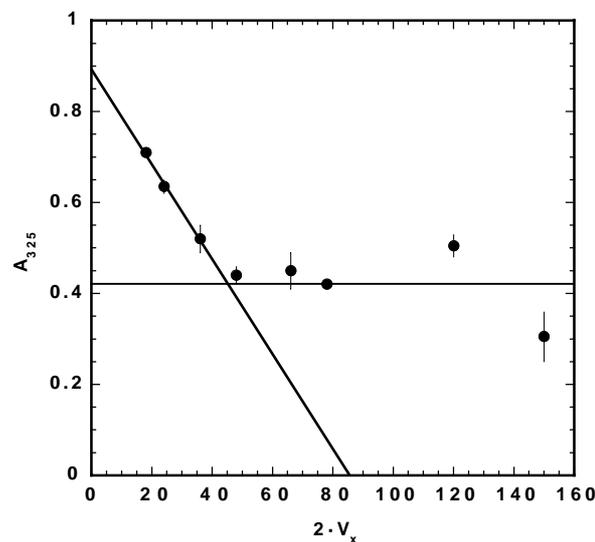
### 3.5.1 Hydrolyse von Dinitrophenylacetat

Mittels der alkalischen Hydrolyse von Dinitrophenylacetat (DNPA) wurden wesentliche Eigenschaften des Quench-Flow-Geräts charakterisiert. Unter 2.4.2 sind die Versuchsbedingungen dieser Messungen aufgeführt und die Sequenzprogramme angegeben, über welche die Vermischung der Reaktionslösungen gesteuert wurde.

#### Waschvolumen

Eine Reaktionskinetik wird durch aufeinander folgende Einzelreaktionen aufgenommen, für die jeweils eine bestimmte Reaktionszeit eingestellt wird. Die Reaktionskapillare (s. Abb. 2.4 und 2.5) muss deshalb vor jeder Reaktion gespült werden, um eine Kontamination mit dem Reaktionsgemisch einer vorhergehenden Reaktion zu vermeiden. Mit dem in Tab. 2.3 angegebenen Sequenzprogramm 1 wurde die Wascheffizienz untersucht. Die Reaktionen erfolgten im kontinuierlichen Modus, d.h. das Reaktionsgemisch passierte die Reaktionskapillare in einem

fortlaufenden Fluss und wurde in Mixer M 3 mit dem Stoppreagenz HCl vermischt (für den Aufbau des Quench-Flow-Instrumens siehe Abb 2.5). Die Lösungen wurden in zwei aufeinander folgenden Phasen in das Kapillarsystem gegeben, für die die gleiche Flussrate  $F$  eingestellt wurde. In Phase I wurde mit unterschiedlichen Volumina des Reaktionsgemischs gewaschen. Das Zeitintervall  $t$  dieser Phase wurde dem Waschvolumen so angepasst wurde, dass die Flussrate und damit die Reaktionszeit konstant blieb. In Phase II wurde eine Fraktion des gestoppten Reaktionsgemischs gesammelt. Abbildung 3.14 zeigt die bei 325 nm gemessenen Absorptionswerte als Funktion des Waschvolumens. Weil die Reaktionskapillare mit dem Produkt DNP aus einer vorhergehenden Reaktion kontaminiert war, war die Absorption bei unzureichenden Waschvolumina erhöht. Die Kurve fiel mit der Erhöhung des Waschvolumens zunächst annähernd linear bis zu einem Umschlagpunkt bei etwa 45  $\mu\text{l}$  ab. Ab diesem Punkt blieb die Absorption im Mittel bei einem konstanten Wert. Der Umschlagpunkt kann als Indiz für das kleinste Waschvolumen gelten, durch das die Reaktionskapillare von Rückständen befreit werden kann. Da das Volumen der Reaktionskapillare 24  $\mu\text{l}$  betrug, sollte nach diesem Ergebnis mindestens mit etwa dem zweifachen Volumen der Reaktionskapillare gewaschen werden.



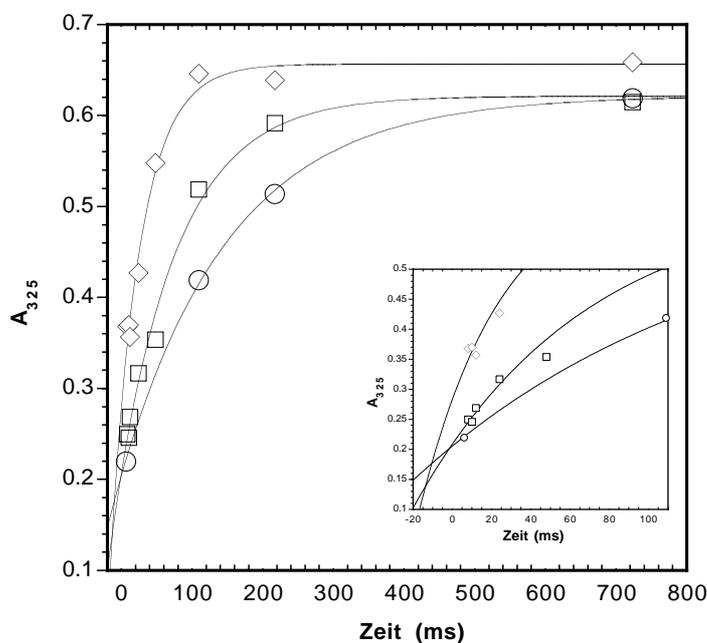
**Abb. 3.14** Waschkurve für das Quench-Flow-Modul

Unter Verwendung einer Reaktionskapillare von 24  $\mu\text{l}$  und dem Sequenzprogramm 1 (Tab. 2.3 unter 2.4.2) wurden 1.5 M DNPA mit 0.4 M NaOH vermischt. Nach einer Reaktionszeit von 6 ms wurden die Reaktionen durch HCl-Zugabe gestoppt. Das Waschvolumen ( $2 \cdot V_x$ ) bezieht sich auf das aus den Spritzen 1 und 2 gegebene Gesamtvolumen vor dem Sammeln der Probe. Es wurden für jedes eingestellte Waschvolumen zwei Proben entnommen. Die Datenpunkte geben jeweils den Mittelwert beider Absorptionswerte und die Fehlerbalken die absolute Abweichung von den Mittelwerten an.

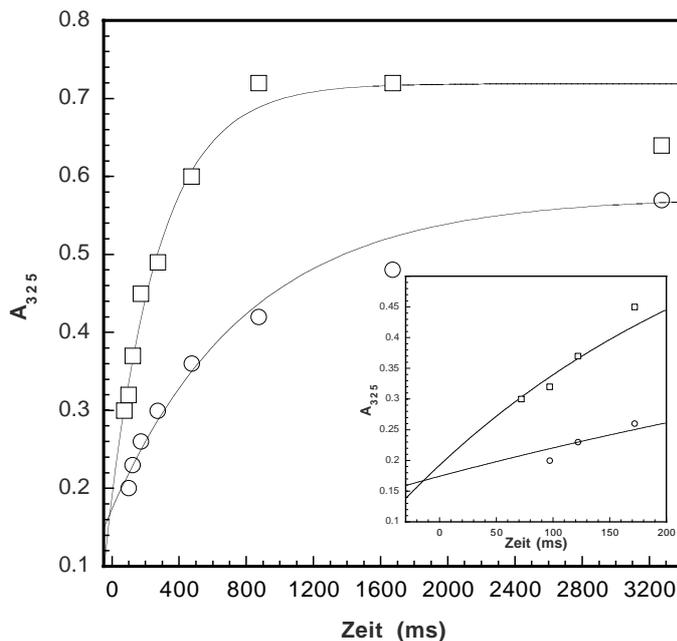
### Reaktionskinetiken der DNPA-Hydrolyse

Die Kinetiken der DNPA-Hydrolyse wurden bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen und unter Verwendung von Sequenzprogrammen im kontinuierlichen und im unterbrochenen Modus gemessen (siehe 2.4.1).

Der Aufbau der Sequenzprogramme im kontinuierlichen Modus (Sequenzprogramm 2 a, Tab. 2.4 und 2 b, Tab. 2.5) entsprach dem Programm zur Untersuchung des Waschvolumens. Verschiedene Reaktionszeiten wurden hier durch eine Änderung der Flussrate  $F$  eingestellt, die in beiden Phasen I und II übereinstimmte. Für kurze Reaktionszeiten (bis 60 ms) wurde das Sequenzprogramm 2 a mit einer Reaktionskapillare von 24  $\mu\text{l}$  und für längere Reaktionszeiten das Programm 2 b mit einer Reaktionskapillare von 217  $\mu\text{l}$  verwendet. Die Reaktionen mit beiden Sequenzprogrammen erfolgten mit denselben Reaktionslösungen, so dass die Datenpunkte für eine NaOH-Konzentration zu jeweils einer Kinetik zusammengefasst werden konnten. In Abb. 3.15 sind Kinetiken bei drei NaOH-Konzentrationen dargestellt.



**Abb. 3.15** Quench-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse im kontinuierlichen Modus  
Reaktionen bei NaOH-Endkonzentrationen von 500 mM ( $\diamond$ ), 250 mM ( $\square$ ) und 125 mM ( $\circ$ ). In der kleinen Graphik ist der Anfangsbereich der Kinetiken in besserer Auflösung dargestellt.



**Abb. 3.16** Quench-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse im unterbrochenen Modus

Die Reaktionen erfolgten bei NaOH-Endkonzentrationen von 50 mM (□) und 25 mM (○). Die kleine Graphik stellt den Anfangsbereich der Kinetiken in besserer Auflösung dar.

Unter Verwendung des Sequenzprogramms 3 (Tab. 2.6) wurden Kinetiken im unterbrochenen Modus gemessen. Die Reaktionskapillare wurde mit dem Reaktionsgemisch gefüllt und der Fluss wurde für eine Zeit  $t_a$  angehalten. Die Reaktionszeiten wurden bei gleichbleibender Flussrate  $F$  und einer Änderung von  $t_a$  eingestellt. Die effektive Reaktionszeit errechnet sich nach Gleichung 2.3. Das Sequenzprogramm unterschied sich außerdem insofern von den bisher genannten Programmen, als dass die Reaktionskapillare und die Mixer nicht mit dem Reaktionsgemisch, sondern mit  $H_2O$  aus Spritze 1 gespült wurden. Das Gemisch wurde ebenfalls durch die Zugabe von  $H_2O$  aus der Reaktionskapillare befördert. Abbildung 3.16 zeigt die mit diesem Programm beobachteten Reaktionskinetiken.

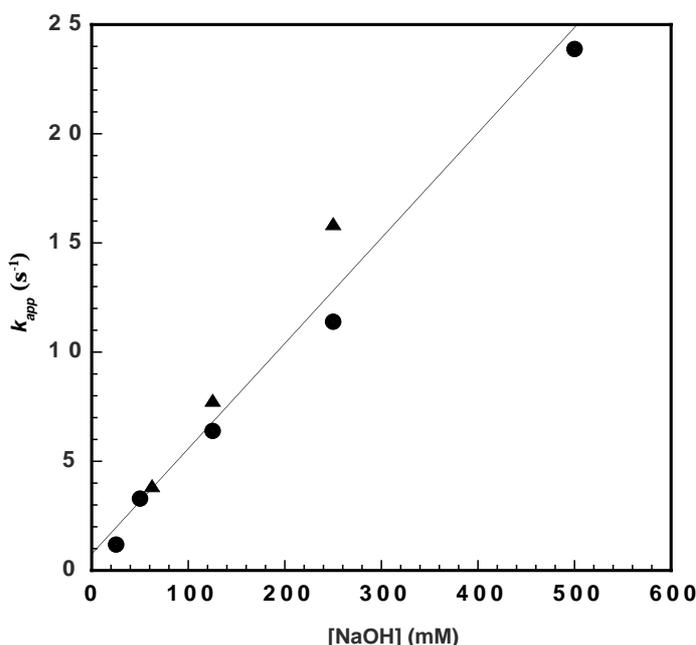
Da der Reaktionspartner NaOH in allen Reaktionen in molarem Überschuss über dem DNPA vorlag, konnten die Reaktionskonstanten nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung und somit durch Anpassen an eine einfache Exponentialfunktion berechnet werden (Gleichung 3.19). Dies wurde mit Hilfe des Programms Kaleidagraph™ durchgeführt. Bei allen Kinetiken (in Abb. 3.15 und 3.16) hat die zeitliche Konzentrationsänderung des Produkts DNP einen den angepassten Funktion entsprechenden exponentiellen Verlauf. Die apparenten Reaktionskonstanten  $k_{app}$  und die nach Gleichung 1.8 daraus abgeleiteten molaren Reaktionskonstanten  $k$  für alle gemessenen Kinetiken sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Der Mittelwert betrug  $k = 51.7 (\pm 8.2) M^{-1} \cdot s^{-1}$ . Beide Sequenzprogramme ergaben gut übereinstimmende

Konstanten und die apparenten Konstanten stiegen erwartungsgemäß linear mit der eingesetzten NaOH-Konzentration an. (Abb. 3.17).

Weiterhin wurden Stopped-Flow Kinetiken aufgenommen, um einen Vergleichswert zu einem anderen Messinstrument zu erhalten (siehe 2.4.2). Hierbei wird die Reaktion nicht chemisch gestoppt, sondern der Konzentrationsverlauf der Reaktionspartner wird direkt absorptionspektrometrisch detektiert. Abbildung 3.18 zeigt die gemessenen Kinetiken bei drei NaOH-Konzentrationen. Es ergab sich eine mittlere Reaktionskonstante von  $62.8 (\pm 0.7) \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Einzelergebnisse sind in Tab. 3.4 und in Abb. 3.17 den Quench-Flow-Messungen gegenübergestellt.

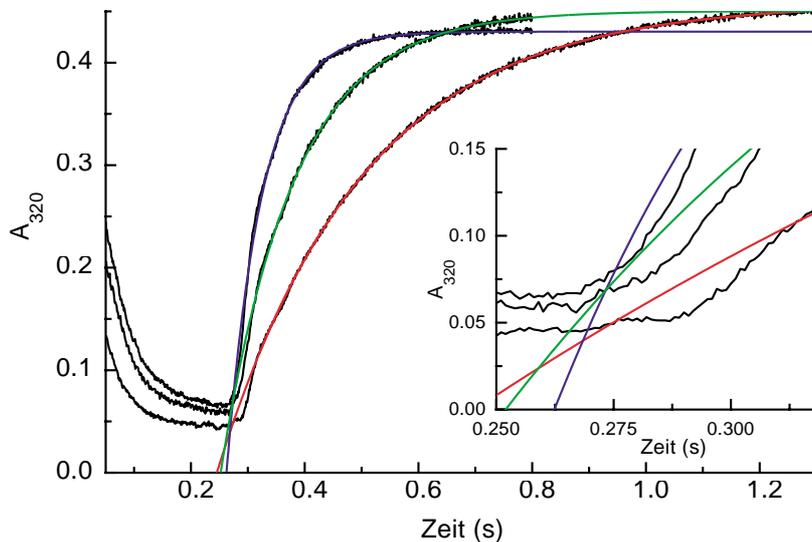
**Tab. 3.4** Reaktionskonstanten der DNPA-Hydrolyse

	[NaOH] (mM)	$k_{app} (\text{s}^{-1})$	$k (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Modus
Quench-Flow	500	23.9	47.8	kontinuierlich
	250	11.4	45.6	kontinuierlich
	125	6.4	51.2	kontinuierlich
	50	3.3	66.0	unterbrochen
	25	1.3	48.0	unterbrochen
Stopped-Flow	250	15.9	63.6	-
	125	7.8	62.4	-
	62.5	3.9	62.4	-



**Abb. 3.17** Abhängigkeit der apparenten Reaktionskonstanten  $k_{app}$  der DNPA-Hydrolyse von der NaOH-Konzentration

● : Quench-Flow-Messungen,  
 ▲ : Stopped-Flow-Messungen.



**Abb. 3.18** Stopped-Flow-Kinetiken der DNPA-Hydrolyse

Wie unter 2.4.2 beschrieben, wird das Kapillarsystem und die Küvette zunächst mit dem Reaktionsgemisch gewaschen. In dieser Zeit sinkt die Absorption auf einen Grundwert ab. Die Absorption wurde aus den gemessenen Lichtintensitäten nach Gleichung 2.4 berechnet. Die Waschphase entspricht dem Verlauf der Kurven bis 0.26 s. Dann wird der Fluss gestoppt, so dass die Reaktion in der Küvette ablaufen kann. Die gezeigten Kurven entsprechen jeweils zehn gemittelten Kinetiken. Farblich dargestellt sind Anpassungsfunktionen, die mit dem Programm Origin (vrs. 3.78) ermittelt wurden, um die Konstanten  $k_{app}$  zu berechnen. Rot: 62.5 mM NaOH, grün: 125 mM NaOH und blau: 250 mM NaOH.

### Totzeit

Bei Flusstechniken kann für alle Reaktionssysteme eine zeitliche Verzögerung angenommen werden. Diese ist durch die Zeit bis zur vollständigen Vermischung der Reaktionspartner, bei Quench-Flow-Reaktionen zusätzlich durch die Zeit bis zur Vermischung des Reaktionsgemischs mit dem Stoppreagenz und der Reaktionszeit der Stoppreaktion, bestimmt. Die tatsächliche Reaktionszeit kann daher länger sein, als aufgrund der Einstellungen des Geräts anzunehmen ist. Der Ursprung, d. h. der Schnittpunkt der Kinetik mit der x-Achse, liegt dann vor dem Zeitpunkt  $t = 0$ . Der Betrag dieser Abweichung ist die Totzeit und kann durch Extrapolation der angepassten Exponentialfunktion ermittelt werden.

In Abb. 3.15 und 3.16 sind die Anfangsbereiche der Quench-Flow-Kinetiken in vergrößerten Bildausschnitten dargestellt. Die Schnittpunkte der extrapolierten Exponentialfunktionen, die dem Nullpunkt der Kinetiken entsprechen, liegen über einem Absorptionswert von  $A_{325} = 0$ . Die Ursache dafür ist, dass zum Zeitpunkt  $t = 0$  das Reaktionsgemisch eine bestimmte Grund-

absorption besitzt, die von der Menge des eingesetzten DNPA abhängig ist. Die Totzeit wurde ausgehend von den paarweisen Schnittpunkten der Exponentialfunktionen abgelesen (bei allen Kinetiken in einer Graphik war die DNPA-Konzentration gleich). Die ermittelten Werte sind in Tab. 3.5 aufgeführt; der Mittelwert ist  $10.1 (\pm 5.6)$  ms. Ein Einzelwert weicht dabei im Vergleich zu den übrigen stark nach unten ab. Die Totzeit bei der Messung im unterbrochenen Modus wich vom Mittelwert nur geringfügig ab. Die ermittelte Totzeit ließ erwarten, dass unterhalb von etwa 10 ms die Kinetik der DNPA-Hydrolyse nicht mehr aufgelöst werden kann. Diese Annahme bestätigte sich durch Messungen bei Reaktionszeiten von 3 - 12 ms im kontinuierlichen Modus.

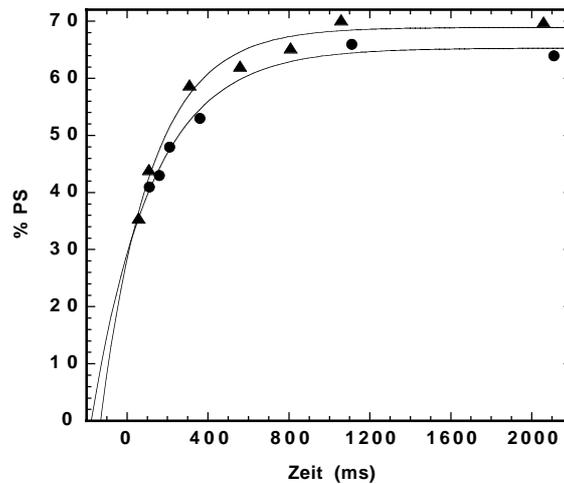
Bei den Stopped-Flow-Kinetiken entspricht der Zeitpunkt  $t = 260$  ms auf der in Abb. 3.18 gezeigten Zeitskala dem Zeitpunkt  $t = 0$ , da hier der Fluss gestoppt wurde und die spektrometrische Detektion der Kinetik begann (siehe 2.4.2). Die Schnittpunkte der angepassten Funktionen variieren um diesen Zeitpunkt im Bereich von 13 ms, so dass hier keine Totzeit abgelesen werden konnte.

**Tab. 3.5** Totzeiten für das Quench-Flow-Gerät

Schnittpunkt	Totzeit (ms)	Modus
1	2.0	kontinuierlich
2	13.7	kontinuierlich
3	10.9	kontinuierlich
4	13.8	unterbrochen

### 3. 5. 2 Bindung von Strept-POD an einfach biotinylierte scDNA

Zur Messung der Reaktionskonstante  $k_1$  von Strept-POD und biotinylierter DNA wurden die unter 2.4.3 aufgeführten Sequenzprogramme 4 a und b (Tab. 2.7 und 2.8) verwendet, mit denen Kinetiken im unterbrochenen Modus aufgenommen werden. Beide Programme unterscheiden sich nur in den zugegebenen Gesamtvolumina, da sie für unterschiedlich große Reaktionskapillaren (117 und 217  $\mu$ l) erstellt wurden. Der Aufbau der Programme entspricht dem mit der DNPA-Hydrolyse getesteten Programm 3, das sich zur Messung von Kinetiken als geeignet erwies.



**Abb. 3.19** Quench-Flow-Kinetiken der Bindung von Strept-POD an einfach biotinylierte DNA  
Die Messungen erfolgten bei Strept-POD-Endkonzentrationen von 60 nM (●) und 80 nM (▲).

Die DNA (pUC18-5/6A-H1/2-E) wurde an der TFO-Erkennungsstelle H1 biotinyliert. In zwei unabhängigen Experimenten erfolgte die Messung bei Strept-POD-Endkonzentrationen von 60 nM und 80 nM. Es wurde die durch die Titration ermittelte Molarität an aktivem Protein zugrundegelegt (s. 3.4). Die Reaktionsprodukte wurden, wie bei der Titration, mit dem Programm BioImage nach Spaltung der DNA mit dem Enzym *HaeIII* und nachfolgender Elektrophorese in einem 8 %igen Polyacrylamidgel quantifiziert. Die Berechnung des prozentualen Anteils an gebundener DNA (% PS) wurde ebenfalls wie bei der Titration durchgeführt (Gleichung 3.20). Die beobachteten Kinetiken sind in Abb. 3.19 dargestellt. Die Plateaus der Kinetiken lagen bei etwa 65 % und 70 % und waren damit etwas niedriger als bei der Titration (80%, Abb 3.13). Das Plateau entspricht dem Teil der TFO-gebundenen DNA, der aktives Biotin enthielt. Da für diese Versuche TFOs aus derselben Stammlösung wie bei der Titration verwendet wurden, wurde die Konzentration an effektiv biotinylierter DNA basierend auf dem dort beobachteten Plateau berechnet. Die DNA-Endkonzentration war 7.5 nM und der Anteil an TFO-gebundener DNA war hier 75 %. Da damit die Endkonzentration der effektiv biotinylierten DNA 4.5 nM betrug, lag Strept-POD in einem etwa ~13 bzw. ~18fachen Überschuss vor. Die Reaktionen verliefen somit nach pseudo-erster Ordnung (Gutfreund, 1995). Zur Berechnung der Reaktionskonstanten musste das stöchiometrische Verhältnis bekannt sein, in dem die Reaktionspartner miteinander reagieren. Es war festzustellen, ob während der Reaktion Komplexe höherer Ordnung entstehen, wie bei der Titration beobachtet wurde (3.4). Dazu wurde die mit *HaeIII* gespaltene DNA einer Probe aus dem Anfangsbereich einer Kinetik im

SFM sichtbar gemacht. Über Strept-POD vernetzte Fragmente wurden jedoch nicht gefunden. Hierbei entstanden keine Komplexe höherer Ordnung, weil (i) die DNA-Konzentration geringer war als bei der Titration (etwa um den Faktor 8) und (ii) die Reaktion nach sehr kurzen Zeitintervallen gestoppt wurde. Die Berechnung der molaren Konstante erfolgte deshalb auf der Grundlage einer Stöchiometrie von 1 mol DNA : 1 mol Strept-POD. Aus beiden Messungen ergab sich eine mittlere Reaktionskonstante  $k_1$  von  $5.3 (\pm 0.3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . In Tab. 3. 6 sind die Werte für  $k_{1app}$  und  $k_1$  aus beiden Messungen getrennt aufgeführt.

Zum Vergleich wurden die Datenpunkte beider Kinetiken auf ein Plateau von 100 % normiert und kombiniert an eine Exponentialfunktion angepasst. Die Reaktionskonstante wurde dann unter der Annahme einer mittleren Strept-POD-Konzentration von 70 nM berechnet. Dies ergab denselben Wert wie der Mittelwert aus beiden Einzelauswertungen.

Es ist außerdem festzustellen, dass bei dieser Reaktion die Totzeit wesentlich größer zu sein scheint, als bei der DNPA-Hydrolyse. Die Schnittpunkte der angepassten Exponentialfunktionen mit der x-Achse lagen bei  $t = -120$  und  $-173$  ms. Um die Totzeit für diese Reaktion genau zu bestimmen, wäre die Beobachtung von kürzeren Reaktionszeiten erforderlich. Dazu wurden Versuche im kontinuierlichen Modus unter Verwendung von Reaktionskapillaren von 24 und 67.5  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Kinetik konnte unterhalb von etwa 60 ms jedoch nicht mehr gut aufgelöst werden.

**Tab. 3.6** Konstanten der Reaktion zwischen Strept-POD und biotinylierter DNA

[Strept-POD], (nM)	$k_{1app}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
60	3.4	$5.6 \cdot 10^7$
80	4.0	$5.0 \cdot 10^7$

## 3. 6 Analyse der intramolekularen Vernetzungsreaktion

### 3. 6. 1 Messprotokoll

Zur Berechnung der intramolekularen Reaktionskonstante  $k_2$  der Vernetzung und der lokalen Konzentration  $j_M$  einer biotinylierten Stelle in der Umgebung der anderen wurde die Vernetzungsrate  $P = [PS_{quer}]/[PSS]$  in den untersuchten Plasmiden bestimmt. Dazu wurde zweifach biotinylierte DNA mit einem Überschuss an Strept-POD in unterschiedlichen Konzentrationen im Quench-Flow-Gerät vermischt (siehe 2.4.4). Die Reaktionen wurden hierbei nicht gestoppt, da  $k_2$  und  $j_M$  aus der Vernetzungsrate ohne Berücksichtigung der Zeit, also auch aus Gleichgewichtsreaktionen, berechnet werden können. Die Bedingungen dafür sind unter 3.3.1 beschrieben. Das Instrument wurde für diese Reaktionen aus zwei wichtigen Gründen eingesetzt:

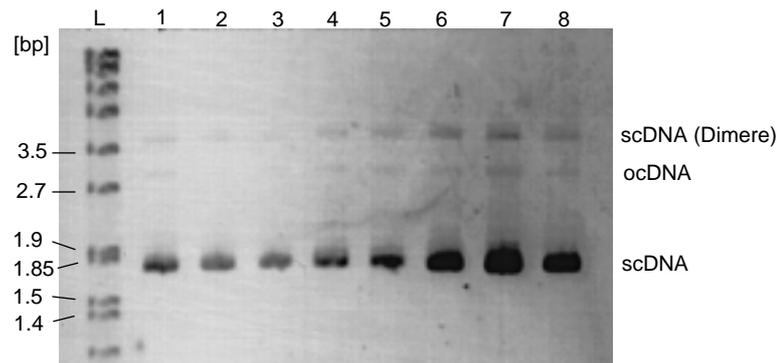
1. Eine hohe Flussrate und die Konstruktion der Mixer im Kapillarsystem des Geräts erlauben eine homogene Durchmischung der DNA mit dem Protein. Dadurch werden lokale Unterschiede in der Proteinkonzentration verhindert, die die Vernetzungsrate beeinflussen können.
2. Das Reaktionssystem ist in Bezug auf die Messung der Reaktionskonstante  $k_1$  von Strept-POD und einfach biotinylierter DNA auf das Quench-Flow-Gerät geeicht.

Zur Vermischung der DNA mit Strept-POD wurde das Sequenzprogramm 5 (Tab. 2.9) erstellt. Die Flussrate entsprach dabei derjenigen bei der Messung der Reaktionskonstanten  $k_1$  ( $F = 2 \mu\text{l/ms}$ ). Nach den Reaktionen wurden die Proben durch Zentrifugation in Vivaspin-Säulen auf  $12 \mu\text{l}$  eingengt und die DNA dann mit dem Enzym *PvuII* gespalten. Durch eine Ethanol-fällung wurde ein Teil des ungebundenen Strept-POD von der DNA getrennt. Zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte wurde die gespaltene DNA dann rasterkraftmikroskopisch dargestellt. Unter Abschnitt 2.2 in diesem Kapitel ist der spezifische Nachweis der Reaktionsprodukte anhand von SFM-Bildern aufgeführt. Es war denkbar, dass einige Faktoren in diesem Protokoll das Messergebnis verfälschen könnten, die daher näher untersucht wurden:

#### Scherkräfte im Quench-Flow-Gerät

Bei einer hohen Flussrate könnten Scherkräfte Einzelstrangbrüche in der DNA hervorrufen. Dann würde ein Teil der scDNA in die ringoffene (oc) Form überführt werden, in der eine um bis zu zwei Größenordnungen geringere intramolekulare Reaktionskonstante (Jian *et al.*, 1998) bzw. lokale Konzentration (Vologodskii *et al.*, 1992) zu erwarten ist. Deshalb wurde scDNA bei verschiedenen Flussraten ( $0.5 - 4 \mu\text{l/ms}$ ) mit  $\text{H}_2\text{O}$  vermischt und danach auf ein 1 %iges

Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.20). Es wurde bei keiner Probe ein erhöhter Anteil an ocDNA gegenüber scDNA im Vergleich zu einer Kontrolle beobachtet, die nicht im Quench-Flow-Gerät vermischt wurde. Eine Beschädigung der scDNA bei der verwendeten Flussrate konnte somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.20** Untersuchung von Scherkräften auf die scDNA im Quench-Flow-Gerät

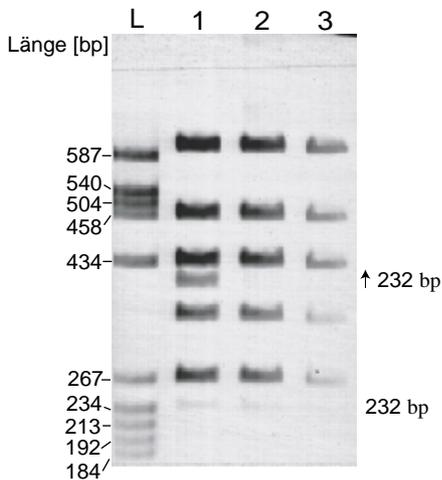
L: Längenstandard, 1-7 Proben-DNA, die bei Flussraten von 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3 und 4  $\mu\text{l}/\text{ms}$  durch das Kapillarsystem des Geräts befördert wurden. Gegenüber der Kontrolle (8) ist kein erhöhter Anteil an ocDNA erkennbar.

### Stabilität der Komplexe bei der SFM-Präparation

Die DNA wurde zur Präparation für die SFM-Aufnahmen zunächst mit Ethanol gefällt. Anhand eines Polyacrylamidgels wurde gezeigt, dass der Ethanolzusatz keinen Einfluss auf die Bindung zwischen der biotinylierten DNA und Strept-POD hatte (Abb. 3.21).

Nach der unter 2.5.2 beschriebenen Methode wurde die DNA zur Mikroskopie auf gespaltenen Glimmer gebunden. Beim Waschen und Trocknen der Probe im  $\text{N}_2$ -Strom könnte die Bindung zwischen Strept-POD und der biotinylierten DNA, sowie die Verknüpfung zwischen den TFOs und der DNA gefährdet sein. Wegen der wirkenden Kräfte wäre außerdem eine selektive Zerstörung der vernetzten Komplexe denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden 160 Moleküle einer Probe auf den SFM-Bildern den jeweiligen Reaktionsprodukten zugeordnet. Dabei waren 59 % der Komplexe entweder vernetzt oder hatten zwei Strept-PODs gebunden. Dieser Anteil entspricht den effektiv zweifach markierten Molekülen. Nach den gelelektrophoretischen Quantifizierungen war die DNA pro Erkennungssequenz zu 70-95 % mit TFOs markiert (siehe 3.2.1). Nach den Titrationen tragen etwa 80 % der TFOs aktives Biotin. Rechnerisch sollten damit 24-58 % der Plasmide zweifach biotinyliert sein. Der auf den SFM-Aufnahmen

bestimmte Anteil repräsentierte somit die theoretisch zu erwartende Obergrenze. Die SFM-Präparation hatte damit keinen erkennbaren Einfluss auf die Stabilität der Komplexe.



**Abb. 3.21** Stabilität der Bindung zwischen Strept-POD und biotinylierter DNA bei Ethanolzusatz

Gezeigt ist ein 6 %iges Polyacrylamidgel (60:1). Die DNA (pUC18-5/6A-H1/2-E) wurde an der Erkennungsstelle H2 markiert und mit *Hae*III gespalten. Die Bindung des TFO4 an H2 kann durch die Wanderungsverzögerung des 232 bp-Fragments nachgewiesen werden (s. auch Abb. 3.5). Spur 1: biotinylierte DNA ohne Strept-POD, Spur 2: biotinylierte DNA mit Strept-POD, Spur 3: biotinylierte DNA mit Strept-POD und Ethanol fällung, L: Längenstandard. Durch die Strept-POD-Bindung verschwindet das  $\uparrow$ 232bp-Fragment. Nach der Ethanol fällung ist kein erhöhter Anteil an ungebundener DNA vorhanden.

### Spreitung der DNA auf dem Glimmer

Um die Vernetzungsrate per Auszählungen auf SFM-Aufnahmen zu bestimmen, muss die DNA möglichst gut auf dem Glimmer gespreitet sein. Dies hängt unter anderem von den Salzbedingungen während der Bindung auf den Glimmer ab. Normalerweise kann DNA in 2-10 mM  $MgCl_2$  und 10-30 mM NaCl gebunden werden (Rivetti *et al.*, 1996; Rippe *et al.*, 1997b). Die DNA kann unter diesen Bedingungen während der Anbindung, bei der sie in zwei Dimensionen gezwungen wird, äquilibrieren. Das bedeutet, dass die DNA auf der Oberfläche eine thermodynamisch günstige Konformation einnimmt, bevor sie immobilisiert wird (Rivetti *et al.*, 1996). Die Konformation eines DNA-Moleküls auf der Oberfläche entspricht damit nicht einfach einer orthogonalen Projektion der dreidimensionalen Konformation des Moleküls in Lösung.

Es wurden verschiedene  $MgCl_2$ -Konzentrationen getestet, um eine optimale Spreitung zu erhalten (Puffer D2, s. 2.5.2). Dabei zeigte sich, dass dies bei 100 mM  $MgCl_2$  ohne Zugabe von NaCl gegeben war.

### 3. 6. 2 Vernetzungsraten

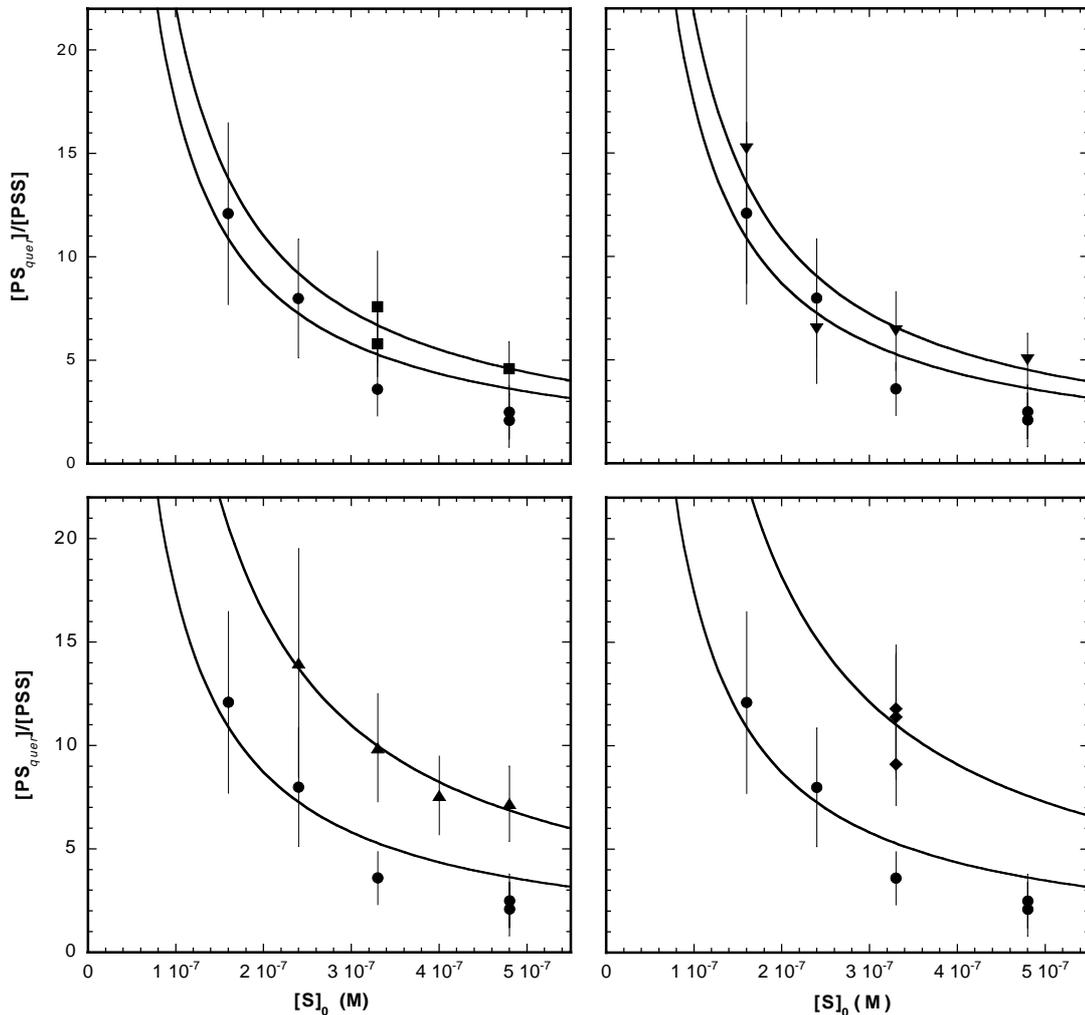
Die Vernetzungsraten  $P$  wurden an fünf verschiedenen Plasmiden gemessen, deren Präparationen wie unter Abschn. 2.3.1 beschrieben charakterisiert wurden. Nach den Klonierungen lagen Plasmide mit Krümmungsinserion des  $A_{5-6}$ -Typs mit unterschiedlichen Biotinylierungspositionen in Relation zum Krümmungszentrum vor (s. Abb. 3.6). Die Differenz des Abstands beider Marker zum Krümmungszentrum  $\Delta s$  reichte von 1 bp, also einer symmetrischen Positionierung, bis 84 bp. Im Plasmid des  $A_4$ -Typs war  $\Delta s = 81$  bp. Zur Bestimmung von  $P$  wurden für jede Probe 60-278 Moleküle ausgezählt, die eindeutig einem der Reaktionsprodukte  $PS_{quer}$  oder PSS zugeordnet werden konnten. Es wurden nur die SFM-Bilder ausgewertet, bei denen  $>90$  % aller Moleküle identifizierbar, d. h. gut auf dem Glimmer gespreitet waren. Der Fehler  $\Delta P$  der Vernetzungsrate aufgrund des Stichprobenfehlers wurde wie unter 3.3.2 aufgeführt bestimmt. In Tab. 3.7 sind die Messergebnisse und die statistischen Fehler für alle Proben zusammengefasst. Da die Reaktionsprodukte  $PS_{quer}$  und PSS kompetitiv entstehen, verringerte sich die Vernetzungsrate mit steigender Strept-POD-Konzentration. Bei vergleichsweise geringer Strept-POD-Konzentration wurden Werte von  $P > 10$  mit einem entsprechend hohen statistischen Fehler beobachtet. Für pUC18-5/6A-H1/4-I/E wurden Messungen bei konstanter Strept-POD-Konzentration vorgenommen, um den gesamten Messfehler abzuschätzen. Dies ergab eine Standardabweichung der Vernetzungsrate von 1.3, die nur in einigen Fällen über dem statistischen Fehler lag.

Die Werte für  $P$  als Funktion der Strept-POD-Konzentration  $[S]_0$  sind in Abb. 3.22 gezeigt. Die Datenpunkte wurden mit dem Programm Kaleidagraph<sup>TM</sup> an Gleichung 3.9 bzw. 3.11 angepasst. In jeder Graphik ist ein Plasmid mit Krümmung dem Kontrollplasmid ohne Krümmung gegenübergestellt. Innerhalb des Fehlerbereichs stimmen die Messwerte gut mit den angepassten Kurven überein, was zeigt, dass das kinetische Modell die Kompetitionsreaktion quantitativ beschreibt. Die Vernetzungsrate sinkt hyperbolisch mit der Strept-POD-Konzentration. Den Graphiken ist weiterhin eine Erhöhung der Vernetzungsrate in Plasmiden mit Krümmung gegenüber der Kontrolle ohne Krümmung zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen waren die Messwerte bei pUC18-5/6A-H1/4-E ( $\Delta s = 49$  bp) und pUC18-5/6A-H1/4-I/E ( $\Delta s = 1$  bp) signifikant von der Kontrolle getrennt, während dies bei den Plasmiden mit größerer Asymmetrie der Marker relativ zur Krümmung ( $\Delta s = 84$  bp,  $A_{5-6}$ -Typ und  $\Delta s = 81$  bp,  $A_4$ -Typ) nicht der Fall war. Bei einer Probe von pUC18-1A-H1/2-E war die Vernetzungsrate deutlich geringer als bei allen anderen Proben. Nach Analyse dieser

Probe in einem Agarosegel zeigte sich, dass die DNA vollständig in der ringoffenen Form vorlag.

**Tab. 3.7** Vernetzungsraten für alle Proben der untersuchten Plasmide

Plasmid (pUC18)	[S] <sub>0</sub> (μM)	$P = [PS_{quer}]/[PSS]$	Fehler $\Delta P$	n
-5/6A-H1/4-I/E	0.33	11.4	± 3.0	161
	0.33	9.1	± 2.0	191
	0.33	11.8	± 2.7	218
	0.33	11.8	± 3.1	167
-5/6A-H1/4-E	0.24	14.0	± 5.5	90
	0.33	9.9	± 2.6	142
	0.40	7.6	± 1.9	120
	0.48	7.2	± 1.8	116
-5/6A-H1/2-E	0.16	15.2	± 6.6	81
	0.24	6.5	± 1.0	278
	0.33	6.4	± 1.7	89
	0.48	5.0	± 1.0	125
-4A-H1/2-E	0.33	7.6	± 2.7	60
	0.33	5.8	± 1.6	82
	0.48	4.6	± 0.9	112
-1A-H1/2-E	0.16	12.1	± 4.4	92
	0.24	8.0	± 2.9	63
	0.33	3.6	± 0.7	106
	0.48	2.1	± 0.3	150
	0.48	2.5	± 0.4	139
-1A-H1/2-E (relaxiert)	0.48	0.56	± 0.09	97



**Abb. 3.22** Vernetzungsraten  $P = [\text{PS}_{\text{quer}}]/[\text{PSS}]$  als Funktion der Strept-POD-Konzentration  $[\text{S}]_0$ . Gezeigt sind jeweils die Datenpunkte für ein Plasmid mit Krümmung, pUC18-4A-H1/2-E (■,  $\Delta s = 81$  bp), pUC18-5/6A-H1/2-E (▼,  $\Delta s = 84$  bp), pUC18-5/6A-H1/4-E (▲,  $\Delta s = 49$  bp) und pUC18-5/6A-H1/4-I/E (◆,  $\Delta s = 1$  bp), gegenüber dem Kontrollplasmid pUC18-1A-H1/2-E ohne Krümmung (●). Die Fehlerbalken geben den statistischen Fehler oder, falls höher, den anhand des Plasmids pUC18-5/6A-H1/4-I/E bestimmten Messfehler an.

### 3. 6. 3 Reaktionskonstanten und lokale Konzentrationen

Es wurden wie unter 3.3.1 angegeben die Reaktionskonstanten  $k_2$  der Vernetzung und die lokalen Konzentrationen  $j_M$  einer reaktiven Gruppe in der Umgebung der anderen berechnet. Die Werte wurden für alle Plasmide durch Anpassen der  $P$ -Werte an die entsprechenden Gleichungen (3.9 bzw. 3.11) ermittelt (für das Plasmid in der ringoffenen Form lag nur ein Datenpunkt für  $P$  vor, so dass hier  $j_M$  und  $k_2$  nicht durch Anpassen berechnet wurden). Tabelle 3.8 zeigt hierzu die Ergebnisse. Es sind ebenfalls  $j_M$ -Werte aufgrund von Computersimulationen gezeigt, die von Konstantin Klenin (unveröffentlicht) für die superhelikalen DNAs durchge-

führt wurden. Die simulierten scDNAs entsprechen hinsichtlich Größe, Superhelixdichte und der Positionen der reaktiven Gruppen in Relation zur Krümmung den hier untersuchten Plasmiden. Ebenfalls waren Temperatur und Salzbedingungen vergleichbar. Der  $j_M$ -Wert für das relaxierte Plasmid wurde nach Gleichung 2.7 berechnet (2.6.3). Dabei wurde eine statistische Segmentlänge der DNA von  $l = 100$  nm (Hagerman, 1988) angenommen, was  $n = 1.65$  Segmenten zwischen den Biotinylierungspositionen und einer Gesamtzahl der Segmente der DNA (2491 bp) von  $N = 8.22$  entspricht.

**Tab. 3.8** Konstanten der Vernetzungsreaktion und lokale Konzentrationen

Plasmid (pUC18)	Superhelix- dichte $\sigma$	$\Delta s$ (bp) <sup>1</sup>	$k_2$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$j_M$ (μM) <sup>3</sup>	$j_M$ (μM), simuliert für $r = 10, 15, 20$ nm <sup>4</sup>
-5/6A-H1/4-I/E	-0.057	1	192.8 (± 11.3)	3.63 (±0.21)	42.2, 21.6, 9.10
-5/6A-H1/4-E	-0.058	49	174.6 (±3.90)	3.30 (±0.07)	30.5, 18.0, 8.80
-5/6A-H1/2-E	-0.056	84	115.1 (±11.2)	2.17 (± 0.20)	16.1, 11.7, 7.60
-4A-H1/2-E	-0.045	81	117.1 (±10.0)	2.20 (± 0.18)	12.1, 9.80, 6.60
-1A-H1/2-E	-0.057	-	92.3 (± 8.9)	1.74 (± 0.25)	4.40, 2.60, 1.40
-1A-H1/2-E	0 (relaxiert)	-	14.2 (± 2.3)	0.27 (± 0.04)	0.11

1. Differenz der Abstände beider Biotinylierungspositionen zum Krümmungszentrum.

2. Berechnet nach Gleichung 3.9 auf der Grundlage der gemessenen Reaktionskonstante  $k_1 = 5.3 \cdot 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

3. Berechnet nach Gleichung 3.11 auf der Grundlage der ermittelten Strept-POD-Aktivität.

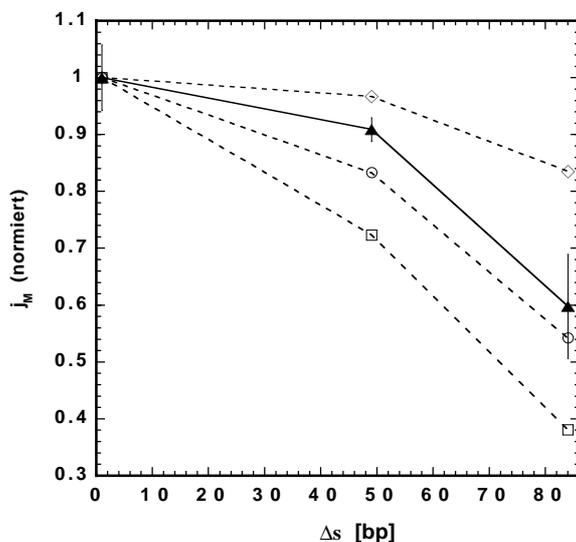
4. Die theoretischen Werte für die superhelikalen Plasmide wurden von Konstantin Klenin mit dem Programm *Corchy* (Klenin *et al.*, 1995) berechnet. Es sind jeweils Werte für drei verschiedene Reaktionsradii  $r$  angegeben. Für das relaxierte Plasmid wurde  $j_M$  nach Gleichung 2.7 ermittelt (Bei dieser Berechnung besitzt  $r$  keine nennenswerte Auswirkung).

Die Fehler für alle superhelikalen Plasmide entsprechen den von dem verwendeten Rechenprogramm (Kaleidagraph™) ausgegebenen Standardfehlern. Für das relaxierte Plasmid ergibt sich der Fehler aus dem statistischen Fehler  $\Delta P$  der Vernetzungsrate (s. Tab. 3.7).

Die Konstante  $k_2$  der Vernetzung war in allen Plasmiden mit Krümmung gegenüber dem Kontrollplasmid ohne Krümmung erhöht. Im Plasmid mit Krümmung des A<sub>5-6</sub>-Typs und symmetrischer Biotinpositionierung war die Erhöhung 2.1fach. Mit dem Grad an asymmetrischer Biotinpositionierung verringerte sich die Reaktionskonstante bis zu einem Wert, der allerdings nur geringfügig über dem der Kontrolle lag (1.9fach für  $\Delta s = 49$  bp und 1.2fach für  $\Delta s = 84$  bp). Unter Berücksichtigung der vom Rechenalgorithmus ausgegebenen Standardfehler waren dabei die Konstanten für die Plasmide mit A<sub>5-6</sub>-Krümmung und variiertem Biotinpositionierung

signifikant voneinander verschieden. Die Werte für die Plasmide mit den Markeranordnungen  $\Delta s = 1$  bp und 49 bp unterschieden sich außerdem signifikant vom Kontrollplasmid. Es konnte kein Unterschied aufgrund verschiedener Krümmungssequenztypen festgestellt werden. Hier sind wegen der übereinstimmenden Biotinpositionierung die Plasmide pUC18-4A-H1/2-E ( $\Delta s = 81$  bp) und pUC18-5/6A-H1/2-E ( $\Delta s = 84$  bp) miteinander vergleichbar, für die annähernd gleiche Reaktionskonstanten beobachtet wurden. Die Konstante für das ringoffene Plasmid war gegenüber dem dazu entsprechenden superhelikalen Plasmid um den Faktor 6.4 verringert.

Über die lokalen Konzentrationen  $j_M$  können die Ergebnisse unmittelbar mit den Computersimulationen der Plasmide verglichen werden. Die relativen Unterschiede der  $j_M$ -Werte zwischen den Plasmiden stimmen wegen Gleichung 3.10 mit denen der Reaktionskonstanten überein. Der simulierte  $j_M$ -Wert ist vom Reaktionsradius  $r$  abhängig (vgl. Abb. 1.1); die in Tab. 3.8 aufgeführten simulierten  $j_M$ -Werte verringern sich für jedes Plasmid erwartungsgemäß mit steigendem  $r$ . Unter 3.2.3 wurde für die Vernetzungsreaktion ein Reaktionsradius von 15-20 nm berechnet. Der gemessene  $j_M$ -Wert für das Kontrollplasmid ohne Krümmung liegt zwischen den simulierten Werten für  $r = 15$  und 20 nm. Dagegen sind die experimentell bestimmten Werte in den Plasmiden mit Krümmung deutlich geringer als aufgrund der Simulationen zu erwarten war. Die Diskrepanz wird mit kleiner werdendem  $r$  größer. Die relativen gemessenen Unterschiede zwischen den Plasmiden mit  $A_{5-6}$ -Krümmung und unterschiedlichen Biotinpositionen stimmen allerdings für den angenommenen Reaktionsradius gut mit den simulierten Daten überein (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23** Lokale Konzentration  $j_M$  in Abhängigkeit vom Grad der Asymmetrie ( $\Delta s$ ) der Biotinpositionen in Relation zum Krümmungszentrum

Die Graphik zeigt simulierte Werte für verschiedene Reaktionsradii  $r$  ( $\square$ :  $r = 10$  nm,  $\circ$ :  $r = 15$  nm und  $\diamond$ :  $r = 20$  nm) und die gemessenen Werte ( $\blacktriangle$ ) für die Plasmide mit  $A_{5-6}$ -Krümmung. Die  $j_M$ -Werte beziehen sich jeweils prozentual auf das bei  $\Delta s = 1$  bp normierte  $j_M$ .



# 4. Diskussion

## 4.1 Untersuchung einer Modellreaktion

Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die an entfernt voneinander liegende Orte auf einem DNA-Molekül binden, können durch eine Schleifenbildung der DNA vermittelt werden (Ptashne, 1986; Bellomy & Record, 1990; Schleif, 1992). Die Interaktionswahrscheinlichkeit ist zu einem großen Teil von der Struktur und der Länge des DNA-Bereichs zwischen den interagierenden Orten sowie von topologischen Eigenschaften der DNA abhängig (Rippe *et al.*, 1995). Quantitative experimentelle Analysen hierzu wurden bisher anhand von prokaryotischen Transkriptionssystemen (Law *et al.*, 1993), Rekombinationssystemen (Parker & Halford, 1991; Oram *et al.*, 1997; Ringrose *et al.*, 1999) oder Zyklisierungsreaktionen mittels Ligase durchgeführt (Dugaiczyk *et al.*, 1975; Shore *et al.*, 1981; Shore & Baldwin, 1983).

In superhelikaler (sc) DNA sind solche Messungen erschwert, weil hier die Geschwindigkeit von intramolekularen Wechselwirkungen im Vergleich zu linearer oder relaxierter DNA sehr hoch ist. Dann ist möglicherweise der *looping*-Prozess nicht für den beobachteten molekularbiologischen Prozess geschwindigkeitsbestimmend (Parker & Halford, 1991; Schulz *et al.*, 2000). Um die Auswirkung von strukturellen Änderungen in scDNA auf intramolekulare Wechselwirkungen zu untersuchen, ist deshalb eine Modellreaktion von Vorteil, die eine direkte Beobachtung der Schleifenbildung erlaubt. Die intramolekulare Vernetzung zweier biotinylierter Stellen in der DNA über Streptavidin erfüllt dies, da die Komplexbildung irreversibel ist und daher die Interaktionsereignisse direkt durch die vernetzten Komplexe repräsentiert werden. Die Irreversibilität der Biotin-Streptavidinreaktion kann bei einer Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $10^{-14}$  M vorausgesetzt werden (Wilchek & Bayer, 1990). Unter 3.2.2 wurde gezeigt, dass die Reaktionsprodukte zwischen zweifach biotinylierter DNA und Streptavidin-Peroxidase (Strept-POD) rasterkraftmikroskopisch nachgewiesen werden können. Kontrollen (3.6.1) legten nahe, dass eine quantitative Auswertung der Vernetzungsreaktion mit diesem Nachweisverfahren möglich ist. Es wurde gezeigt, dass eine Kompetitionreaktion stattfindet, für die ein kinetisches Modell beschrieben wurde (3.3.1). Die durchschnittlichen Reaktionszeiten zur Bildung der kompetitiv entstehenden vernetzten DNAs

( $PS_{quer}$ ) und der mit zwei Strept-PODs gebundenen DNAs (PSS) bestimmen die Vernetzungsrate  $P$  bei gegebener Strept-POD-Konzentration  $[S]_0$ . Anpassen der  $P$ -Werte bei verschiedenen  $[S]_0$  an Gleichung 3.9 bzw. 3.11 zeigte, dass das Modell die Reaktion quantitativ beschreibt (Abb. 3.22). Die intramolekulare Reaktionskonstante  $k_2$  kann damit aus der Vernetzungsrate berechnet werden.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war, die gewonnenen Ergebnisse mit numerischen Simulationen zu vergleichen. Der Vergleichswert war dabei die lokale Konzentration  $j_M$ , die aus den kinetischen Messungen nach Gleichung 3.11 abgeleitet wurde. Dies setzt jedoch voraus, dass  $j_M$  für die Vernetzungsrate tatsächlich bestimmend ist. Per Definition ist  $j_M$  dem im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegenden Anteil an Molekülen proportional, bei denen sich ein Ort in der DNA innerhalb eines bestimmten Reaktionsradius um einen zweiten Ort auf demselben DNA-Molekül befindet (Jacobson & Stockmayer, 1950; Rippe *et al.*, 1995). Die Geschwindigkeit der irreversiblen Vernetzungsreaktion ist dagegen durch die Zeit bis zu einer erfolgreichen Kollision beider reaktiver Gruppen gegeben. Die Vernetzungsgeschwindigkeit ergibt sich damit nicht unbedingt nur aus der Verteilung der DNA-Konformationen im Gleichgewicht, sondern sollte ebenfalls durch die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen der DNA bestimmt sein. Bei der hier beobachteten Kompetitionsreaktion bestimmt jedoch die im Moment der Proteinzugabe vorliegende Verteilung der scDNA-Konformationen die Vernetzungsrate  $P$ , die deshalb als proportional zu  $j_M$  angenommen werden kann. Allerdings könnte  $j_M$  überschätzt werden, falls die mehrfache Bindung von Biotin an Streptavidin kooperativ erfolgt. Es ist gezeigt worden, dass die Inkubation von Biotin-gesättigtem mit Biotin-freiem Streptavidin nach einigen Tagen einen gleichmäßig verteilten Biotinylierungsgrad über alle Streptavidine liefert, was eine kooperative Bindung ausschließt (Jones & Kurzban, 1995).

Mittels der Vernetzungsreaktion wurde der Einfluss einer lokalen DNA-Krümmung auf Fernwechselwirkungen in scDNA untersucht. Es wurden Plasmide hergestellt, die über triplexbildende Oligonukleotide (TFOs) zweifach biotinyliert werden können. Die Markierung erwies sich für alle TFO-Erkennungssequenzen als spezifisch (2.2). Plasmide mit Krümmung, die an verschiedenen Positionen markiert werden konnten, wurden mit einem Plasmid ohne Krümmung verglichen. Für Simulationen der Plasmide dienten die ermittelten Superhelixdichten (Tab. 3.2) und die genauen TFO-Verknüpfungspositionen (Abb. 3.6) als Berechnungsgrundlage. Damit waren experimentelle und simulierte Befunde miteinander vergleichbar. Die Ver-

netzungsreaktionen fanden bei einer Ionenkonzentration von 80 mM Na<sup>+</sup> statt, die ebenfalls mit der in den Simulationen vergleichbar war.

Die lokale Konzentration  $j_M$  einer Markerposition in der Umgebung der anderen und die intramolekulare Reaktionskonstante  $k_2$  konnten nur bei Kenntnis der aktiven Strept-POD-Konzentration und der Assoziationsgeschwindigkeit von Strept-POD an das erste Biotin in der DNA bestimmt werden. Dies geht aus den Gleichungen 3.9 und 3.11 hervor. Es werden daher zunächst die Ergebnisse der dazu durchgeführten Messungen diskutiert.

## 4.2 Kalibrierung des Reaktionssystems

### 4.2.1 Bindungsaktivität von Strept-POD

Bei der Inkubation von einfach biotinylierter DNA mit Streptavidin entsteht eine Verteilung verschiedener Komplexe mit 1-3 über Streptavidin verknüpften DNA-Molekülen. Dies wurde bereits gelelektrophoretisch beobachtet (Sano *et al.*, 1995). Dass die vier Bindungsstellen des Streptavidins nicht vollständig abgesättigt werden, kann als Folge einer sterischen Behinderung durch die DNA interpretiert werden. Diese Beobachtung steht auch mit Befunden im Einklang, nach denen die Bindungsaffinität mit der Größe der biotinylierten DNA-Moleküle sinkt (Huang *et al.*, 1996). Hier wurde allerdings an Polystyrolatexpartikel gebundenes, also immobilisiertes Streptavidin, verwendet, was einen weiteren sterischen Einfluss hatte. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Strept-POD-Konjugat kann gegenüber Streptavidin die Bindungsaffinität zusätzlich verringern, weil die Aminosäureketten der mit dem Streptavidin verknüpften Peroxidasen den Zugang zu den Biotinbindungsstellen behindern könnten. Außerdem könnte die Struktur der scDNA, dessen Superhelixdomänen einen bestimmten Raum einnehmen, die Bindung beeinflussen. Aus diesen Gründen wurde die Konzentration des aktiven Strept-POD für biotinylierte scDNA bestimmt und nicht für freies Biotin.

Die beobachtete Bindungskurve bei der Titration von einfach biotinylierter DNA mit Strept-POD stieg im Anfangsbereich linear an (Abb. 3.13). Auf SFM-Bildern einer Titrationsprobe dieses ansteigenden Bereichs konnten die entstandenen Komplexe identifiziert und quantifiziert werden. Der Großteil der Komplexe bestand in Monomeren (37.6 %) und Dimeren (55.9 %), was auf das reduzierte Bindungsvermögen von Strept-POD für biotinylierte scDNA hinweist. Die ermittelte aktive Konzentration von 2.4 pmol/μl liegt deshalb deutlich

(um den Faktor 2.9) unterhalb der vom Hersteller (Pierce, Rockford, USA) angegebenen Konzentration.

## 4. 2. 2 Quench-Flow-Kinetiken

Die Reaktionskonstante  $k_1$  von Strept-POD und einfach biotinylierter DNA wurde im Quench-Flow-Gerät gemessen, durch das Reaktionskinetiken im Millisekundenbereich beobachtet werden können. Die Reaktionspartner werden in einem Mixer in Kontakt gebracht, den die Lösungen bei hoher Flussrate passieren. Die Reaktion erfolgt, während das Reaktionsgemisch durch eine Kapillare fließt. Das Gemisch erreicht nach einer definierten Zeit einen zweiten Mixer, in dem ein Stoppreagenz zugesetzt wird (Abb. 2.4).

### Charakterisierung des Quench-Flow-Geräts

Zu einer Einschätzung der Messgenauigkeit und der Reproduzierbarkeit von Reaktionskonstanten wurde das Instrument zunächst anhand einer geeigneten Testreaktion, der alkalischen DNPA-Hydrolyse, charakterisiert. Die Kinetik dieser Reaktion kann bei einem Überschuss des alkalischen Reagenzes NaOH in einem breiten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Damit können die Reaktionskonstanten nach dem vereinfachten Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung berechnet werden (siehe 1.4), und das Instrument kann für verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten getestet werden. Außerdem absorbiert das Reaktionsprodukt Dinitrophenol (DNP) Licht bei 325 nm pH-unabhängig, womit es bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen ohne Korrektur quantifiziert werden kann (Gutfreund, 1969).

Frühere Messungen der DNPA-Hydrolyse in einem anderen Quench-Flow-Gerät ergaben eine Reaktionskonstante von  $55.0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Gutfreund, 1969), die mit dem Wert der vorliegenden Arbeit von  $51.7 (\pm 8.2) \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  gut übereinstimmt. Um einen weiteren Vergleichswert zu erhalten, wurden unter Verwendung derselben NaOH-Stammlösung wie bei den Quench-Flow-Messungen Stopped-Flow-Kinetiken aufgenommen (Abb. 3.18). Der Aufbau dieses Instruments ist dem Quench-Flow-Gerät ähnlich, nur dass hier die Reaktion nicht chemisch gestoppt wird. Unmittelbar nach der Vermischung der Reaktionspartner wird der Konzentrationsverlauf während der ablaufenden Reaktion spektroskopisch detektiert. Dabei wurde eine Reaktionskonstante von  $62.8 (\pm 0.7) \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  ermittelt, die oberhalb der im Quench-Flow-Gerät bestimmten Konstante liegt. Unter Berücksichtigung der Fehlerbereiche ist die Abweichung jedoch gering.

Die apparenten Reaktionskonstanten  $k_{app}$  stiegen linear mit der NaOH-Konzentration an (Abb. 3.17). Dies zeigt, dass das Instrument reproduzierbare Messungen bei verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten gewährleistet. Dabei erfolgten die Reaktionen bei einem kontinuierlichen oder einem unterbrochenen Fluss des Reaktionsgemischs durch die Reaktionskapillare (siehe 2.4.2 und Kinetiken in Abb. 3.15 und 3.16). Es war erforderlich, die Messung für Strept-POD und einfach biotinylierte DNA im unterbrochenen Modus durchzuführen, da dadurch der Verbrauch von Probenmaterial deutlich reduziert werden konnte. Die Testmessungen zeigten, dass dieser Modus dazu geeignet war.

Die Totzeit ist für ein bestimmtes Reaktionssystem ein gerätespezifischer Parameter. Sie ist unter anderem ein Maß für die Mischeffizienz und damit für die erreichbare Auflösung von Reaktionskinetiken. Die Testmessungen ergaben einen Wert von 10.1 ms, der im Vergleich zu einer Totzeit von 3 ms für die DNPA-Hydrolyse in dem von Gutfreund (1969) angeführten Quench-Flow-Apparat etwas höher liegt (siehe 3.5.1).

### **Reaktionskonstante von Strept-POD und einfach biotinylierter DNA**

Die Messung der Reaktionskonstante von Strept-POD und biotinylierter DNA bei zwei unterschiedlichen Strept-POD-Konzentrationen ergab einen Mittelwert von  $k_1 = 5.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mit einer prozentualen Abweichung von 5.6%. Die prozentuale Standardabweichung bei den Messungen der DNPA-Hydrolyse betrug 15.9 %. Somit lag die Messung von  $k_1$  innerhalb des aus den Testmessungen zu erwartenden Fehlerbereichs.

Es wurden Reaktionsbedingungen hergestellt, die eine Berechnung der Reaktionskonstante nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung, also durch Anpassen der Datenpunkte an eine Exponentialfunktion, erlauben (siehe 1.4). Strept-POD lag in einem ~13 bzw. ~18fachen Überschuss über der effektiv biotinylierten DNA vor (vgl. 3.5.2). Ein 10facher Überschuss ist die Untergrenze, um noch eine Reaktion pseudo-erster Ordnung annehmen zu können (Gutfreund, 1995). Andernfalls würde die zeitliche Konzentrationsänderung des Proteins wesentlich zum Verlauf der Kinetik beitragen, die damit zweiter Ordnung wäre (siehe 1.4). Simulationen zeigen, dass die nach pseudo-erster Ordnung berechneten Konstanten um 3 % bei einem 10fachen und um 5.8 % bei einem 5fachen Überschuss unterhalb der theoretischen Werte liegen (Gutfreund, 1995). Abbildung 3.19 zeigt eine gute Übereinstimmung der beobachteten Datenpunkte mit den angepassten Exponentialfunktionen.

In der Literatur liegen kaum Vergleichswerte für die Reaktionskonstanten von Streptavidin und Biotin bzw. biotinylierter DNA vor. Allerdings wurden Konstanten für die schon genannte Reaktion zwischen biotinylierter DNA und an Polystyrollatexpartikel gebundenem Streptavidin bestimmt (Huang *et al.*, 1996). Dabei sank die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Größe der DNA-Moleküle und der Größe der Latexpartikel. Die Konstanten waren um 1-3 Größenordnungen geringer als der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Wert. Dieser Unterschied kann mit der Immobilisierung des Streptavidins erklärt werden. Das Ergebnis der Quench-Flow Messung kann außerdem mit der angegebenen Reaktionskonstante für Biotin und dem Analogon des Streptavidins Avidin von  $7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  bei pH 5.25 (Wilchek & Bayer, 1990) verglichen werden. Für Streptavidin wie auch für Avidin ist die Bindungsaffinität für Biotin pH-abhängig. Bei einer Erhöhung des pH von 5.0 auf 7.0 steigt die Dissoziationskonstante für Avidin während sie für Streptavidin sinkt. Der Biotin-Avidinkomplex weist dabei geringere Dissoziationskonstanten auf (Wilchek & Bayer, 1990; Piran & Riordan, 1990). Gegenüber der Dissoziationsrate des Streptavidin-Biotinkomplexes bei pH 7.0 ist die des Avidin-Biotinkomplexes bei pH 5.0 um den Faktor 30 und bei pH 7.0 um den Faktor 60 geringer (Wilchek & Bayer, 1990). Da die Gleichgewichtskonstanten für beide Komplexe etwa übereinstimmen (Green, 1990), sollte damit die Assoziationsrate von Biotin an Streptavidin wesentlich schneller sein als an Avidin. Dass der hier gemessene Wert nicht höher ist, als der genannte Wert für Biotin-Avidin, lässt sich wahrscheinlich auf die sterischen Einflüsse durch die superhelikalen DNA-Moleküle zurückführen. Diese Interpretation stimmt auch mit den Ergebnissen von Huang *et al.* (1996) überein.

## 4.3 Fernwechselwirkungen in scDNA

### 4.3.1 scDNA ohne Krümmung

Die internen Bewegungen der DNA vermitteln intramolekulare Wechselwirkungen. In linearer DNA erfolgt eine Interaktion nur unter einer Verbiegung des zwischen den reaktiven Orten liegenden DNA-Bereichs, von dessen Länge die Interaktionswahrscheinlichkeit abhängt (Rippe *et al.*, 1995; Levene & Crothers, 1986; Merlitz *et al.*, 1998; Ringrose *et al.*, 1999). In scDNA können ebenfalls Verbiegungen der DNA bzw. der Superhelixachse zu einem Interaktionsergebnis führen. In stärkerem Maße bestimmen jedoch Umformungen der Gesamtkonformation des scDNA-Moleküls oder eine Bewegung der gegenüberliegenden DNA-Stränge entlang der

Superhelixkontur die intramolekulare Kontaktwahrscheinlichkeit bzw. Kontaktgeschwindigkeit (Vologodskii *et al.*, 1992; Chirico & Langowski, 1996; Jian *et al.*, 1998; Klenin & Langowski, 2001a; Klenin & Langowski, 2001b). Dabei tragen Konformationen, bei denen sich beide reaktive Gruppen in der Superhelix direkt gegenüberliegen, überwiegend zu Interaktionen bei (Vologodskii *et al.*, 1992; Klenin & Langowski, 2001a; Klenin & Langowski, 2001b). Bei der Strept-POD-Vernetzung sollte jede Art der internen Bewegungen zu einer Reaktion führen können, da die TFOs an der DNA frei beweglich sind. Die Vernetzung sollte keine bestimmte geometrische Orientierung der TFO-Verknüpfungsstellen zueinander erfordern.

Für das Kontrollplasmid ohne Krümmung wurde eine intramolekulare Reaktionskonstante von  $92.3 \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Im Vergleich zu intramolekularen Kinetiken in scDNA (ohne Krümmung), die mit der durch Tn3-Resolvase katalysierten ortsspezifischen Rekombination untersucht wurden, ist die Strept-POD-Vernetzung wesentlich schneller (Parker & Halford, 1991; Oram *et al.*, 1997). Zwei Resolvasen binden in diesem System spezifisch an entfernt lokalisierte Orte (*res*-Bindungsstellen) auf der DNA, bei deren Interaktion sich ein synaptischer Komplex bildet. Dieser ist die Voraussetzung für die Rekombinationsreaktion, bei der die DNA in eine Katenanstruktur überführt wird. Es wurde zunächst eine Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Bildung des synaptischen Komplexes von 10-100 ms in einer 5.0 kb großen scDNA ermittelt (Parker & Halford, 1991). Nähere Analysen unter Verwendung eines Quench-Flow-Geräts zeigten dann, dass die Rekombination nach einer schnellen Phase (20 ms) in langsamere Phasen überging und erst nach über 100 s vollständig abgelaufen war (Oram *et al.*, 1997). Dieses Verhalten wurde mit der teilweisen Entstehung und nachfolgenden Umordnung von unterschiedlich stabilen, nichtproduktiven synaptischen Komplexen erklärt, die durch ungünstige scDNA-Konformation hervorgerufen werden (Oram *et al.*, 1997; Sessions *et al.*, 1997). Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Strept-POD-Vernetzung errechnet sich aus der gemessenen Reaktionskonstante  $k_2$  nach

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2}. \quad (4.1)$$

Dies liefert für das Plasmid ohne Krümmung 7.5 ms. Die Geschwindigkeit der Strept-POD Vernetzung ist wahrscheinlich wesentlich schneller als die Entstehung des synaptischen Komplexes, weil dabei prinzipiell jede Art von internen Bewegungen zu einer Reaktion führen kann.

Die Interaktionskinetik in scDNA wurde ebenfalls mittels Simulationen analysiert. Dabei wurde die durchschnittliche Zeit  $\tau_F$  bis zu einer erstmaligen Kollision zweier Orte berechnet. Die durchschnittliche Reaktionszeit entspricht der Relaxationszeit  $\tau$ , die gleich dem Kehrwert der Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion ist. Für die Relaxationszeit der Vernetzung gilt daher

$$\tau = \frac{1}{k_2}, \quad (4.2)$$

was 10.8 ms für das Plasmid ohne Krümmung ergibt. Simulationen, die mit der Vernetzungsreaktion hinsichtlich DNA-Länge, Superhelixdichte, Abstand der Marker und Salzbedingungen vergleichbar waren, ergaben durchschnittliche Kollisionszeiten  $\tau_F$  von 2.5 ms (Huang *et al.*, 2001) bzw. 1.5 ms (Klenin & Langowski, 2001a) für einen Reaktionsradius von  $r = 10$  nm. Für den berechneten Reaktionsradius bei der Vernetzung (siehe 3.2.3) von  $r = 15$ -20 nm wurde eine Reaktionszeit von etwa 1.0 ms berechnet (Klenin & Langowski, 2001a). Diese Zeiten sind wesentlich geringer als die durchschnittliche Reaktionszeit der Strept-POD-Vernetzung. Eine Erklärung dafür ist, dass nicht das erste Zusammentreffen des gebundenen Strept-POD mit der zweiten biotinylierten Stelle zu einer Reaktion führt. Die Zeit  $\tau_R$  von der ersten Kollision bis zur entgültigen Reaktion ist von der Reaktionskonstante der miteinander reagierenden Gruppen abhängig, die für diese in freier Lösung gilt (intrinsische Reaktionskonstante).  $\tau_R$  trägt dann bemerkbar zur Reaktionszeit bei, wenn diese Konstante unterhalb einem Wert für eine diffusionskontrollierte Reaktion liegt. Die gemessene Konstante  $k_1 = 5.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  von einfach biotinylierter DNA und Strept-POD entspricht näherungsweise der intrinsischen Konstanten für die Vernetzung, die damit nicht diffusionskontrolliert ist (Cantor & Schimmel, 1980b). Klenin & Langowski (2001b) simulierten die durchschnittliche gesamte Reaktionszeit  $\tau_\Sigma = \tau_F + \tau_R$  für verschiedene intrinsische Konstanten, was für die Strept-POD-Vernetzung  $\tau_\Sigma = 8.0$  ms lieferte (hierbei allerdings für  $r = 10$  nm). Dieser Wert entspricht in guter Näherung der gemessenen Relaxationszeit von 10.8 ms. Die Reaktionszeit  $\tau_F$  bis zur ersten Kollision betrug in dieser Brown'schen Dynamik-Simulation 3.0 ms.

Der für scDNA ohne Krümmung bestimmte  $j_M$ -Wert von 1.74  $\mu\text{M}$  kann bedingt mit Analysen der Transkriptionsrepression verglichen werden (Law *et al.*, 1993). In Plasmid-DNA wurde dabei die lokale Konzentration des an einen Operator gebundenen Repressors in der Umgebung des zweiten Operators *in vivo* bestimmt.  $j_M$  bezog sich allerdings auf die schwer

abschätzbare Aktivität von freiem Repressorprotein in *E. coli*. Abhängig von der helikalen Orientierung der Operatoren zueinander lag  $j_M$  zwischen 1.0 und 10.0  $\mu\text{M}$ . Dies zeigt, dass mit sehr verschiedenen Methoden ein  $j_M$ -Wert für scDNA in etwa übereinstimmender Größenordnung experimentell bestimmt wurde.

Die Simulationen für das Plasmid ohne Krümmung ergaben bei  $r = 15 \text{ nm}$   $j_M = 2.6 \mu\text{M}$  und bei  $r = 20 \text{ nm}$   $j_M = 1.4 \mu\text{M}$  (s. Tab. 3.8). Hier stimmen die Simulationen wiederum bemerkenswert gut mit dem experimentell bestimmten Wert überein. Dieser ist weiterhin um den Faktor 6.4 gegenüber dem Wert für die relaxierte Form (ocDNA) des Plasmids ohne Krümmung erhöht (0.27  $\mu\text{M}$ ). Wegen der hohen Kompaktierung von scDNA im Vergleich zu ocDNA war ein deutlicher Unterschied zu erwarten. Dies ist deshalb eine gute Kontrolle dafür, inwieweit ein Einfluss von strukturellen Unterschieden der DNA auf die Kontaktwahrscheinlichkeit durch das verwendete Reaktionssystem detektiert werden kann. Der Wert für das relaxierte Plasmid ist aber nicht gut abgesichert, da er nur auf einer Einzelmessung beruht (Tab. 3.7). Nach Monte-Carlo-Simulationen sollte  $j_M$  für den gegebenen Reaktionsradius in scDNA etwa um eine Größenordnung gegenüber ocDNA erhöht sein (Vologodskii *et al.*, 1992). Die Berechnung für das untersuchte relaxierte Plasmid nach Gleichung 2.7 (siehe 2.6.3) liefert in guter Übereinstimmung zu den Berechnungen von Vologodskii *et al.* (1992) 0.11  $\mu\text{M}$ ; verschiedene Reaktionsradii  $r$  fielen hierbei nicht ins Gewicht. Für ocDNA ist der gemessene Unterschied zur scDNA damit etwas geringer, als die theoretischen Analysen erwarten ließen.

### 4. 3. 2 scDNA mit Krümmung

Eine lokale Krümmung zwischen interagierenden Orten in der DNA kann die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit stark beeinflussen. In scDNA befindet sich ein gekrümmter DNA-Bereich bevorzugt in einer superhelikalen Endschleife (Klenin *et al.*, 1995; Sprouss & Harvey, 1996; Laundon & Griffith, 1988; Wedemann *et al.*, 1998; Pfannschmidt & Langowski, 1998). Computersimulationen begründen die Vermutung, dass die in der Endschleife liegende Krümmung die Konformation des gesamten Moleküls organisiert. Es resultiert eine festgelegte scDNA-Konformation, wobei zwei im symmetrischen Abstand zur Krümmung lokalisierte Orte sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Superhelix direkt gegenüberliegen (Klenin *et al.*, 1995). Um diesen Effekt quantitativ zu charakterisieren, wurden die Vernetzungsraten in Plasmiden mit Krümmung im Vergleich zu einem Plasmid ohne Krümmung bestimmt. Es wurden weiterhin Plasmide des A<sub>5-6</sub>-Krümmungstyps bei einer symmetrischen

und zwei verschiedenen asymmetrischen Anordnungen der Biotinmarker in Relation zur Krümmung untersucht (Abb. 3.6). Der Verbiegungswinkel der Krümmungsinsertionen beträgt nach verschiedenen experimentellen Analysen mindestens  $100^\circ$  (Koo *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1999; Tóth *et al.*, 1998). Für die Simulationen der untersuchten Plasmide wurde deshalb dieser Winkel angenommen. Bei früheren Berechnungen mit dem für die untersuchten Plasmide verwendeten Computermodell hatte eine Erhöhung des Verbiegungswinkels von  $100^\circ$  auf  $120^\circ$  bei vergleichbarem Abstand der wechselwirkenden Orte keine weitere Steigerung von  $j_M$  zur Folge. Eine Änderung fand nur unterhalb von  $100^\circ$  statt (Klenin *et al.*, 1995).

Die intramolekulare Reaktionskonstante und damit  $j_M$  sank, wie aufgrund der Endschleifenposition der Krümmung zu erwarten war, mit dem Grad an asymmetrischer Anordnung der Marker in den Plasmiden des A<sub>5-6</sub>-Krümmungstyps (Tab. 3.8). Gegenüber einer symmetrischen Anordnung war  $j_M$  bei einer um 84 bp asymmetrischen Positionierung um den Faktor 1.7 verringert. Die prozentualen Unterschiede der  $j_M$ -Werte bestätigen dabei die Computersimulationen der untersuchten Plasmide für den berechneten Reaktionsradius im Bereich von  $r = 15-20$  nm sehr genau, wobei nahe  $r = 15$  nm die Übereinstimmung am größten ist (Abb. 3.23). Durch das Computerprogramm wurde bereits eine deutliche Fernwirkung einer Krümmung über 1000 bp in einer 2700 bp großen scDNA vorausgesagt (Klenin *et al.*, 1995). Wegen der quantitativen Übereinstimmung kann hier umgekehrt auf eine entsprechende Wirkung in den untersuchten Plasmiden geschlossen werden: die Krümmung wirkt mindestens über einen Bereich von 24% der Gesamtlänge der Moleküle.

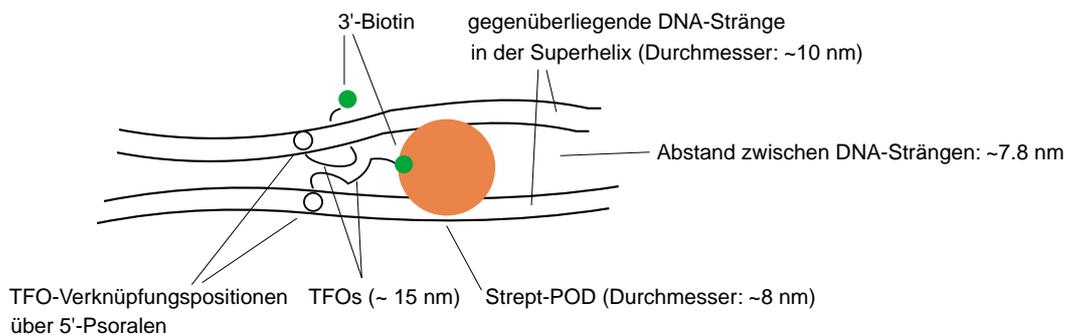
Weiterhin wurde in den Plasmiden mit Krümmung eine Steigerung der Interaktionswahrscheinlichkeit gegenüber der Kontrolle beobachtet. Bei einer symmetrischen Markerpositionierung war die Erhöhung 2.1fach ( $j_M = 3.63 \mu\text{M}$  gegenüber  $1.74 \mu\text{M}$ ). In qualitativer Hinsicht steht dies mit der Erwartung im Einklang, nach der eine zentral zwischen interagierenden Orten liegende Krümmung die Interaktionswahrscheinlichkeit steigern kann (Klenin *et al.*, 1995; Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). Quantitativ scheint das Ergebnis jedoch nicht den Einfluss widerzuspiegeln, den die Simulationen für eine Endschleifenpositionierung der Krümmung vorhersagen: Diese lassen eine Erhöhung um den Faktor 8.3 für  $r = 15$  nm ( $21.6 \mu\text{M}$  gegenüber  $2.6 \mu\text{M}$ ) bzw. 6.5 für  $r = 20$  nm ( $9.1 \mu\text{M}$  gegenüber  $1.5 \mu\text{M}$ ) erwarten. Die gemessene Steigerung von  $j_M$  ist außerdem geringer, als dies bei gegebener Distanz der Marker für lineare DNA gelten würde (Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). Nach Berechnungen von Sprou & Harvey (1996) liegt ein gekrümmter DNA-Bereich in scDNA ebenfalls in

einer Endschleife. Jedoch besteht, im Gegensatz zum Monte-Carlo-Modell von Klenin *et al.* (1995), kein signifikanter Einfluss auf die Interaktionswahrscheinlichkeit ab einer Distanz von einer Persistenzlänge (150 bp, (Hagerman, 1988)) zwischen Krümmung und den interagierenden Orten. In diesem Modell finden mit großer Häufigkeit Verzweigungen und andere Umlagerungen der scDNA-Konformation statt, weil das scDNA-Molekül sehr flexibel ist. Eine Krümmung kann weit entfernte DNA-Bereiche deshalb nicht bemerkbar beeinflussen. Die geringe gemessene Steigerung von  $j_M$  könnte dieses Modell bestätigen, was allerdings den oben genannten Befunden für variierte Biotinpositionen in den Plasmiden mit Krümmung widerspricht. Diese anscheinend inkonsistenten Ergebnisse sind möglicherweise dadurch erklärbar, dass weitere gekrümmte Bereiche außerhalb der *ClaI*-Insertion die Kontaktwahrscheinlichkeit beeinflussen. In den Monte-Carlo-Simulationen werden außer der Krümmung an der Stelle der *ClaI*-Insertion keine Sequenzeigenschaften berücksichtigt. Die Krümmungsanalyse der Plasmide unter Verwendung des Modells von Bolshoy *et al.* (1991) lässt in den Plasmiden außer der starken Krümmung innerhalb der *ClaI*-Insertionen des A<sub>4</sub>- und des A<sub>5-6</sub>-Typs zwei weitere schwächer gekrümmte Bereiche erkennen, welche die DNA-Konformation, insbesondere des Kontrollplasmids, beeinflussen könnten (Abb. 3.4). Andererseits sind nach rasterkraftmikroskopischen Analysen von sequenzspezifisch markierter DNA außer der Endschleifenposition der gekrümmten *ClaI*-Insertionen keine weiteren bevorzugten Konformationen der untersuchten Plasmide hervorgetreten. Im Kontrollplasmid war die Position des Markers statistisch entlang der Superhelixkontur verteilt (Pfannschmidt & Langowski, 1998). Es ist also fraglich, ob die Ergebnisse durch Sequenzeigenschaften der gesamten Plasmid-DNA zu erklären sind. Eine plausiblere Erklärung ist, dass strukturelle Merkmale des Reaktionssystems die intramolekulare Reaktivität beeinflussen. Ein sterischer Effekt ist dabei als sehr wahrscheinlich anzunehmen.

### **Modell einer sterischen Behinderung in scDNA mit Krümmung**

Ein sterischer Einfluss auf die intramolekulare Reaktivität ist wegen der Größe des Strept-POD im Vergleich zum Abstand der sich in der Superhelix gegenüberliegenden DNA-Stränge möglich. Der mittlere Durchmesser der Superhelix beträgt, bezogen auf die Doppelhelixachse der DNA, aufgrund von Messungen mittels Neutronenstreuung etwa 10 nm bei den Salzbedingungen in den Vernetzungsreaktionen (Hammermann *et al.*, 1998; Hammermann, 1999). Ein ähnlicher Wert wurde durch rasterkraftmikroskopische Analysen ermittelt (Rippe *et al.*, 1997b). Der Raum zwischen den gegenüberliegenden DNA-Strängen umfasst unter der

Annahme eines B-DNA-Durchmessers von 2.2 nm (Cantor & Schimmel, 1980a) damit rechnerisch im Mittel 7.8 nm. Eine Berechnung des Durchmessers von Strept-POD mit dem Computerprogramm Sedenterp (siehe 2.6.4) auf der Grundlage des partialspezifischen Volumens  $v_{\text{bar}}$  für die gesamte Aminosäuresequenz des Konjugats ergibt 8.0 nm. Bei dieser Berechnung kann der Hydratisierungsgrad berücksichtigt werden; das Protein wird allerdings als kugelförmig betrachtet. Der Durchmesser des Strept-POD ist damit nicht deutlich kleiner als der Abstand zwischen den gegenüberliegenden DNA-Strängen in der Superhelix. Dies wäre jedoch die Voraussetzung für eine freie Beweglichkeit des an einem TFO gebundenen Strept-POD zwischen den gegenüberliegenden Strängen (Abb 4.1).



**Abb. 4.1** Schematische Struktur des Komplexes aus zweifach biotinylierter DNA und Strept-POD  
Die Darstellung zeigt einen Ausschnitt der Superhelix für eine Konformation, bei der sich die TFO-Verknüpfungspositionen gegenüberliegen.

Kann diese molekulare Struktur in den Plasmiden mit Krümmung zu einer reduzierten Reaktivität führen, im Plasmid ohne Krümmung jedoch nicht? Darauf könnten DLS-Messungen (dynamische Lichtstreuung) hinweisen, die eine deutlich verringerte Amplitude der internen Bewegungen von scDNA mit Krümmungsinsertionen zeigten (Kremer *et al.*, 1993; Diekmann & Langowski, 1995). Der Effekt wird auch durch Computersimulationen vorhergesagt (Chirico & Langowski, 1996) und spiegelt die Endschleifenpositionierung einer Krümmung wider, die eine vergleichsweise festgelegte DNA-Konformation herbeiführen sollte. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass das an einem TFO gebundene Strept-POD für eine bestimmte Zeit an einer Seite der Superhelix fixiert wird und dem zweiten Biotin erschwert zugänglich ist. Die relativen Unterschiede bei verschiedenen Markerpositionen in Relation zur Krümmung sind unter dieser Annahme dennoch durch  $j_M$  bestimmt, da die Reaktivität jeweils der gleichen Bedingung unterliegt. Die Konformation eines scDNA-Moleküls ohne Krümmung fluktuiert dagegen wesentlich häufiger, so dass das Strept-POD mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zwi-

schen den Strängen der Superhelix bewegt wird. Ein deutlicher Unterschied zwischen scDNA mit und ohne Krümmung im Hinblick auf diesen sterischen Effekt ist vor allem deshalb denkbar, weil der Durchmesser des Strept-POD etwa dem Abstand der gegenüberliegenden DNA-Stränge entspricht. Unter diesen Voraussetzungen können die vorliegenden Befunde als weiterer Hinweis auf eine durch die Krümmung festgelegte DNA-Konformation gewertet werden.

### Krümmungsinduzierende Sequenztypen

Die Vernetzungsreaktion wurde für zwei verschiedene krümmungsinduzierende Sequenztypen untersucht (Tab. 2.1). Hierbei waren die Plasmide pUC18-4A-H1/2-E und pUC18-5/6A-H1/2-E wegen der übereinstimmenden Markerpositionierung vergleichbar (Abb. 3.6). Das A<sub>5-6</sub>-Insert weist nach Messungen der Gelanomalie eine stärkere Krümmung auf als das A<sub>4</sub>-Insert (Diekmann, 1986; Diekmann, 1987b), weswegen Interaktionen durch den A<sub>5-6</sub>-Krümmungstyp stärker beeinflusst sein sollten. Die  $j_M$ -Werte unterschieden sich jedoch für beide Plasmide nicht voneinander. Es ist zu bemerken, dass für die Simulationen keine unterschiedlichen Verbiegungswinkel für beide Krümmungstypen angenommen wurden. Der Grund dafür war, dass der dabei angenommene Winkel von 100° für beide Typen wahrscheinlich eine Unterschätzung des tatsächlichen Winkels darstellt und eine genaue Festlegung damit nicht sinnvoll war. Die Simulationen ergaben einen verringerten  $j_M$ -Wert für den A<sub>4</sub>-Typ (Tab. 3.8), weil die Superhelixdichte  $\sigma$  dieses Plasmids geringer war (Tab. 3.2). Die Tatsache, dass dagegen die gemessenen Werte für beide Typen etwa gleich sind, widerspricht nicht dem oben genannten Modell der sterischen Behinderung. Der Superhelixdurchmesser steigt hyperbolisch mit geringer werdendem  $\sigma$  (Boles *et al.*, 1990; Rybenkov *et al.*, 1997). Die Beweglichkeit des initial gebundenen Strept-POD zwischen den gegenüberliegenden DNA-Strängen in der Superhelix könnte somit im Plasmid des A<sub>4</sub>-Typs leicht verbessert sein. Dies entspräche der Beobachtung, dass die Wahrscheinlichkeit der Katenanbildung zwischen superhelikaler und zyklisierender linearer DNA mit zunehmendem  $\sigma$  sinkt (Rybenkov *et al.*, 1997).

## 4.4 Schlussfolgerungen

Kleine superhelikale DNA-Moleküle, die nicht mit Proteinen assoziiert sind, können als die einfachste übergeordnete Struktur der DNA betrachtet werden. An solchen Molekülen sind detaillierte Untersuchungen zu strukturellen Eigenschaften der DNA möglich, die denen *in vivo* in vielen Aspekten ähneln. Die Ergebnisse können deshalb Hinweise auf die Eigenschaften komplizierterer Organisationsstufen der DNA liefern, wie bakterielle oder eukaryotische Chromosomen. Die Struktur und die Dynamik von scDNA, die auch die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit entfernter Orte beeinflusst, wurde daher vielfach untersucht. Zu einer quantitativen Bestimmung der Interaktionswahrscheinlichkeit in scDNA überwiegen allerdings noch theoretische Analysen.

Über die irreversible Vernetzung zweier biotinylierter Positionen über Streptavidin in scDNA können intramolekulare Interaktionen direkt beobachtet werden. Mit dem verwendeten kinetischen Modell für die dabei stattfindende Kompetitionsreaktion kann die intramolekulare Reaktionskonstante  $k_2$  und die lokale Konzentration  $j_M$  bestimmt werden. Für das Plasmid ohne Krümmung stimmen die ermittelten Ergebnisse gut mit simulierten Kinetiken und lokalen Konzentrationen überein. Es bestätigt sich damit die im Vergleich zu linearer und relaxierter DNA hohe Interaktionswahrscheinlichkeit in scDNA (Vologodskii *et al.*, 1992; Klenin *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). Unter Berücksichtigung der intrinsischen Reaktionskonstante des initial gebundenen Strept-POD und der zweiten biotinylierten Stelle belegt die intramolekulare Reaktionszeit, dass entfernt lokalisierte Orte in scDNA im Millisekundenbereich zusammentreffen (Jian *et al.*, 1998; Klenin & Langowski, 2001a; Klenin & Langowski, 2001b; Huang *et al.*, 2001). Dies kann für die Untersuchung von molekularbiologischen Prozessen, die unter DNA-Schleifenbildung verlaufen, sehr wichtig sein. So kann bei der Transkriptionsaktivierung durch *Enhancer* in scDNA der Aktivierungsprozess auf die ermittelte Kinetik der *loop*-Bildung bezogen werden. Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil die vorliegenden Ergebnisse Simulationen bestätigen, mit denen man intramolekulare Reaktionsgeschwindigkeiten für verschiedene intrinsische Reaktionskonstanten von interagierenden Proteinen berechnen kann (Klenin & Langowski, 2001b).

Die ermittelten  $k_2$  bzw.  $j_M$ -Werte zeigen weiterhin Unterschiede, die mit dem Einfluss der Krümmungsinsertionen systematisch zusammenhängen. Die gemessenen relativen Unterschiede aufgrund symmetrischer/asymmetrischer Markerpositionen in Relation zur Krüm-

mung weisen auf eine deutliche Fernwirkung einer Krümmung auf die scDNA-Konformation hin. Hierbei stimmen die Ergebnisse mit den Computersimulationen quantitativ überein, die eine starke Wirkung der in einer Endschleife lokalisierten Krümmung auf intramolekulare Wechselwirkungen vorhersagen (Klenin *et al.*, 1995). Dem steht die geringe Erhöhung der Interaktionswahrscheinlichkeit in scDNA mit Krümmung im Vergleich zur Kontrolle ohne Krümmung entgegen. Wie unter 4.3.2 vorgeschlagen, könnte die Diskrepanz durch eine sterische Behinderung hervorgerufen werden, die dadurch verstärkt wird, dass eine Krümmung in scDNA eine vergleichsweise festgelegte scDNA-Konformation erzeugt. Unter dieser Annahme bestätigen alle Befunde der vorliegenden Arbeit die theoretische Vorhersage einer starken Wirkung von DNA-Krümmung auf die dreidimensionale Struktur von scDNA. Insbesondere ist der bisher mikroskopisch beobachtete Effekt nun, zusammen mit Ergebnissen aus DLS-Messungen (Kremer *et al.*, 1993; Diekmann & Langowski, 1995), für scDNA in freier Lösung charakterisiert worden.

Die Möglichkeit einer sterischen Behinderung zeigt, dass die geometrische Anordnung und die Größe von interagierenden Proteinen bei Untersuchungen von intramolekularen Wechselwirkungen in scDNA nicht außer Acht gelassen werden darf. Es ergibt sich eine weitere Konsequenz für die Wirkung einer Krümmung auf die Transkriptionsaktivierung durch *Enhancer*, die in einer kurzen Distanz vom Promotor lokalisiert sind (100-150 bp, wie bei der Aktivierung von RNAP• $\sigma^{54}$  durch die Aktivatorproteine NtrC oder NIFA): Eine Krümmung könnte sich über die Promotor- und *Enhancer*-DNA hinaus auf weitere Bereiche des bakteriellen Chromosoms auswirken. Ein prokaryotischer *Enhancer* kann die Transkription auch an verschiedenen Promotoren aktivieren (Belitsky & Sonenshein, 1999). Eine hypothetische Schlussfolgerung ist, dass eine durch ein krümmendes Protein erzeugte Konformationsänderung der DNA dafür ein regulatorisches Potential darstellt. Insbesondere kann eine lokale Krümmung in scDNA auch Promotor-*Enhancer*-Interaktionen über mehrere hundert Basenpaare hinweg beeinflussen.

Die Doppelmarkierung von scDNA über TFOs, die von Frau Claudia Pfannschmidt etabliert (Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998) und in der vorliegenden Arbeit durch die Klonierungen ausgebaut wurden, erlauben auch die spezifische Markierung der Plasmide mit zwei verschiedenen Markern. Es ist deshalb möglich, durch Messungen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) die lokale Konzentration in scDNA und die Dynamik dieser Moleküle weitergehend zu untersuchen. Außerdem könnte die Vernetzungsreaktion in

Verbindung mit dem Markierungsverfahren für scDNA angewendet werden, die an einer Stelle an ein Substrat, wie z. B. an Latexpartikel, gebunden ist. Dies würde die Dynamik der in Schleifendomänen organisierten chromosomalen DNA von Prokaryoten und Eukaryoten in einem weiteren Aspekt nachstellen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Fernwechselwirkungen in superhelikalen (sc) Plasmid-DNAs mit und ohne gekrümmten Insertionen untersucht. Grundlage war der experimentell und theoretisch gut belegte Befund, nach dem gekrümmte Sequenzbereiche bevorzugt eine Endschleifenposition in scDNA einnehmen. Daraus sollte eine festgelegte dreidimensionale scDNA-Konformation resultieren, die nach theoretischen Berechnungen die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit von Orten in der DNA beeinflusst, die von der Krümmung weit entfernt liegen können.

Der Einfluss von Krümmung auf Fernwechselwirkungen in scDNA wurde durch kinetische Messungen der intramolekularen Vernetzung zweier sequenzspezifisch biotinylierter Stellen in der DNA über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Strept-POD) quantitativ charakterisiert. Dazu wurden schnelle Kinetiken in einem Quench-Flow-Instrument aufgenommen. Die Markierung der DNA erfolgte über triplexbildende Oligonukleotide (TFOs), die mit Biotin modifiziert waren. Die verwendeten Ausgangsplasmide (Derivate von pUC18) enthielten bereits eine TFO-Erkennungssequenz sowie eine von unterschiedlichen Insertionen, von denen zwei Typen eine sequenzinduzierte Krümmung aufwiesen, während ein anderer ungekrümmt war. Die Krümmung wird durch Adeninblöcke hervorgerufen, die sich in helikaler Phase der DNA wiederholen. Aus diesem Material wurde ein Satz von Plasmiden hergestellt, die zweifach über TFOs biotinyliert werden konnten, wobei die Krümmungsinsertion jeweils zwischen den Markern lag. Für einen Krümmungstyp befanden sich die Biotinylierungsstellen in symmetrischer oder in asymmetrischer Entfernung zur Krümmung. Die Marker waren 501-609 bp in etwa 2500 bp großen DNA-Molekülen voneinander entfernt.

Zunächst wurden die Reaktionsprodukte zwischen zweifach biotinylierter DNA und Strept-POD rasterkraftmikroskopisch identifiziert. Es entstehen kompetitiv Komplexe, die entweder intramolekular vernetzt sind oder die zwei Strept-PODs gebunden haben. Ein kinetisches Modell für diese Reaktion erlaubt die Berechnung der lokalen Konzentration  $j_M$  einer Markerposition in der Umgebung der anderen und der intramolekularen Reaktionskonstanten aus der Vernetzungsrate. Dadurch war ein direkter Vergleich von experimentellen und theoretischen Daten zur Interaktionswahrscheinlichkeit in scDNA möglich. Die Bindungsaktivität des Strept-POD für biotinylierte scDNA wurde in Titrationsexperimenten bestimmt. Weiterhin

war die Bestimmung der Reaktionskonstante von freiem Strept-POD und einer biotinylierten Stelle in der DNA erforderlich, die im Quench-Flow-Gerät an einfach biotinylierter DNA gemessen wurde.

Die Vernetzungsreaktionen wurden ebenfalls im Quench-Flow-Instrument durchgeführt und die Reaktionsprodukte wurden daraufhin rasterkraftmikroskopisch quantifiziert. Die daraus bestimmten  $j_M$ -Werte und intramolekularen Reaktionskonstanten wurden mit Computersimulationen der untersuchten Plasmide verglichen. Für scDNA ohne Krümmung stimmten experimentelle und simulierte Befunde nahezu genau überein. Weiterhin sank  $j_M$  in quantitativer Übereinstimmung mit den Simulationen für zunehmend asymmetrische Positionen der Marker in Relation zur Krümmung. Allerdings widersprach eine geringe Erhöhung von  $j_M$  in scDNA mit Krümmung gegenüber einer Kontrolle ohne Krümmung den Simulationen, die einen stärkeren Einfluss erwarten ließen. Dies ist wahrscheinlich auf eine sterische Behinderung des an einer biotinylierten Stelle gebundenen Strept-POD in der Superhelix zurückzuführen. Der Effekt trat in scDNA mit Krümmung, dessen Bewegungsfreiheitsgrade wegen der Endschleifenposition der Krümmung reduziert sind, deutlich hervor. In Verbindung mit den Simulationen deuten die Befunde darauf hin, dass eine lokale Krümmung in scDNA Interaktionen zwischen Orten über große Entfernungen beeinflussen kann.

## 6. Abstract

In this work long-range interactions in supercoiled (sc) DNAs with or without curved inserts were studied. The investigations were based on the experimental and theoretical finding that a curved DNA segment preferentially takes an end loop position in scDNA. This should result in a preferred 3-dimensional scDNA conformation, which was theoretically predicted to affect the interaction probability of sites being located far away from the curvature on the DNA.

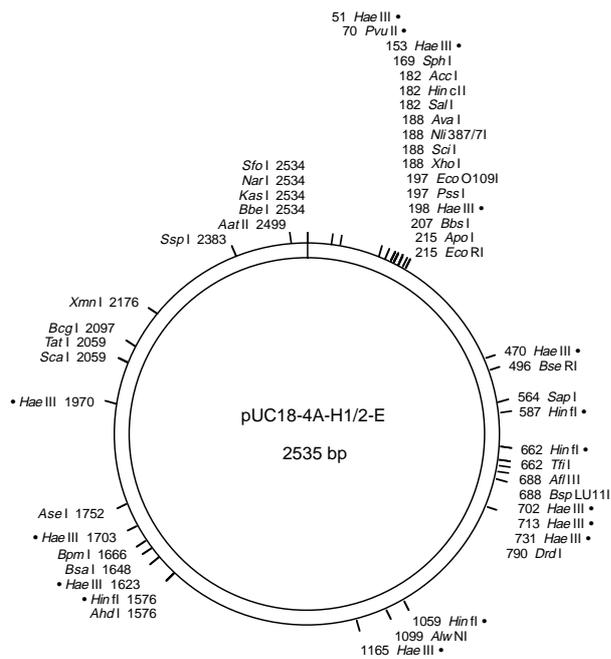
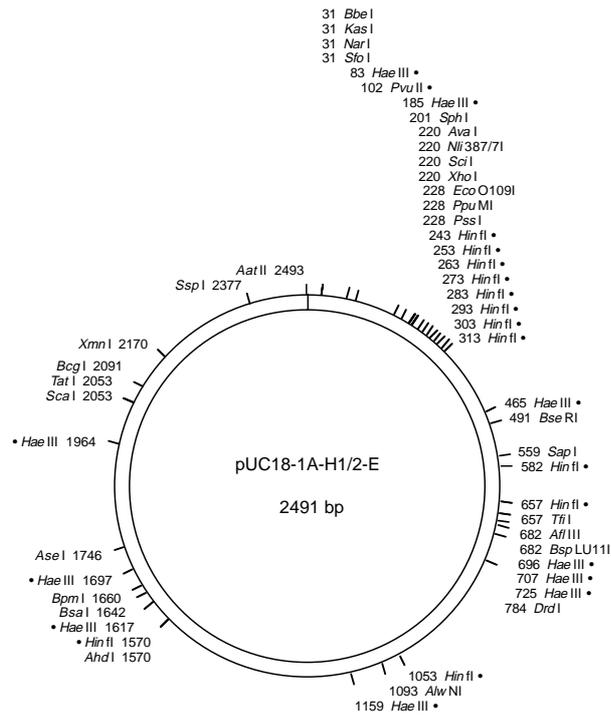
The influence of a DNA curvature on long-range interactions in scDNA was characterised quantitatively by measuring the kinetics of the intramolecular crosslink formation of two specifically biotinylated sites *via* a streptavidin-peroxidase conjugate (strept-POD). A quench-flow-device was used to observe fast kinetics. DNAs were labeled with triplex forming oligonucleotides (TFOs) modified with biotin. The original plasmid-DNAs used (derivatives of pUC18) already contained one TFO-recognition sequence and one of different inserts, of which two types exhibit intrinsic curvature and one is uncurved (Pfannschmidt & Langowski, 1998; Pfannschmidt, 1998). The curvature is due to tracts of adenins phased with the helical turns of the DNA. Using this material a set of plasmids was designed which can be double labeled with TFOs in a way, such that the insert is located between the labels. For one curvature inducing sequence type the labels were located at symmetrical or asymmetrical distances with respect to the curvature. The distance between labels was 501-609 bp in scDNAs of about 2500 bp.

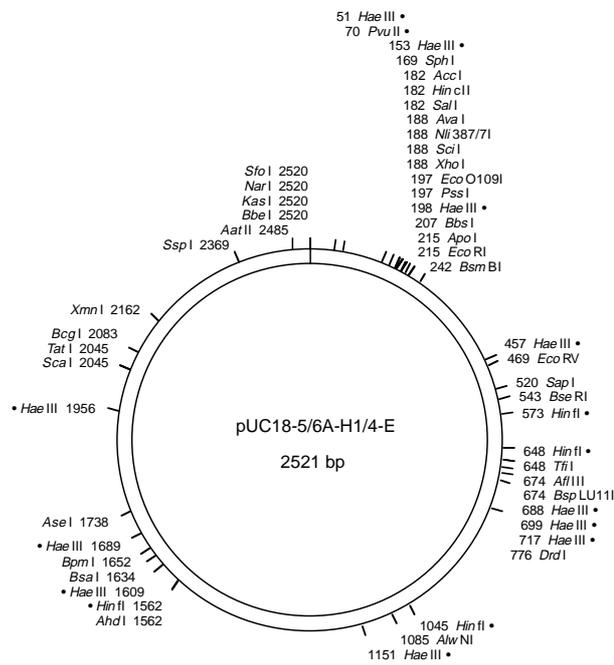
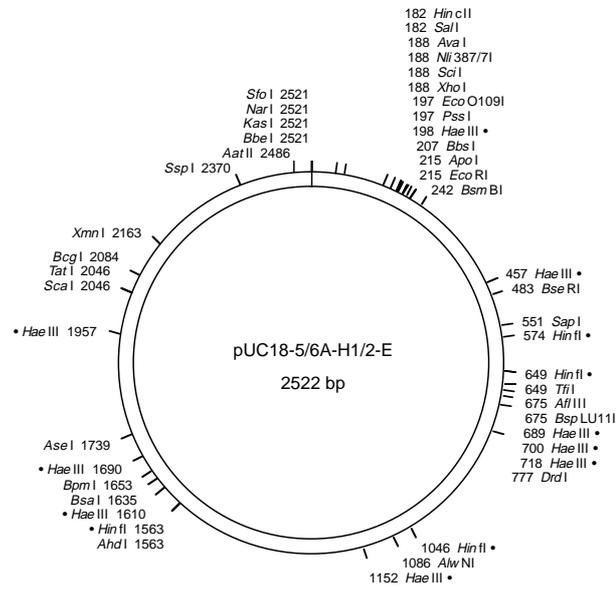
The reaction products of double biotinylated DNA and strept-POD were identified by scanning force microscopy. In a competition reaction complexes form, which could either be intramolecularly crosslinked or to which two strept-PODs are bound. A kinetic model for this reaction was used for the calculation of the local concentration  $j_M$  of one biotinylated site in the vicinity around the other and the intramolecular rate constant of crosslinking. This allowed a direct comparison of experimental and theoretical data of the interaction probability in scDNA. The binding activity of strept-POD with respect to biotinylated scDNA was measured in titration experiments. Furthermore the rate constant of strept-POD and a biotinylated site on the DNA was determined by using the Quench-Flow-instrument with single biotinylated DNA.

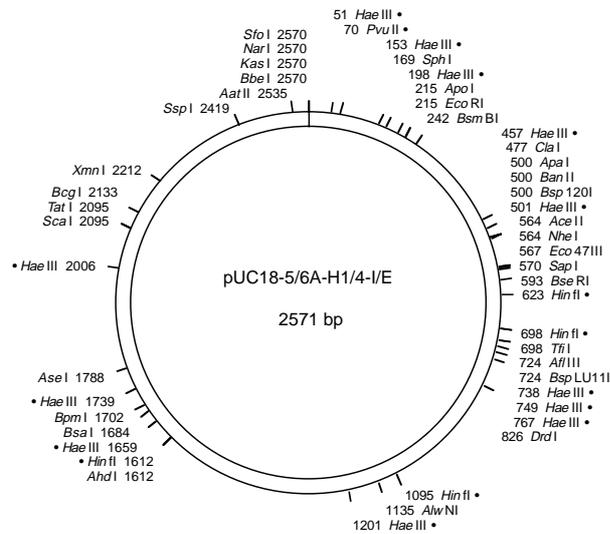
The crosslink reactions were also performed in the Quench-Flow-apparatus and the reaction products were subsequently quantified by scanning-force microscopy. The measured  $j_M$ -values and intramolecular rate constants were compared to computer simulations of the analyzed plasmids. For scDNA without curvature the experimental and simulated values agreed almost exactly. Furthermore,  $j_M$  decreased in quantitative agreement with the simulations by increasing the degree of asymmetry of the label positions with respect to the curvature. A rather small increase of  $j_M$  in DNAs with curvature as compared to a control without curvature was, however, in contradiction to the simulation, where a substantially stronger effect was expected. This is most likely due to a sterical hindrance of an initially bound strept-POD in the superhelix. The effect was apparent only in scDNA with curvature, since in such a molecule internal motions are reduced due the end loop position of the curvature. Combined with the simulations the findings suggest that a local curvature in scDNA influences interactions of sites on the DNA over long distances.

# 7. Anhang

## 7.1 Plasmidkarten







In den Plasmidkarten sind alle Einzelschnittstellen und die Schnittstellen der im Laufe der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Letztere sind jeweils durch einen Punkt markiert.

## 7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin oder Absorption
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
ddGTP	Didesoxyguanosin
dG	Desoxyguanosin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DLS	dynamische Lichtstreuung ( <i>dynamic light scattering</i> )
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (N= Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymidin)
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4- <u>D</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
Kb	Kilobasen (1000 Basen)
kD	Kilodalton
M	molar (g/mol)
mg	Milligramm
min	Minuten
μ-	mikro-
ms	Millisekunde(n)
nm	Nanometer
NIFA	<i>nitrogen fixation protein A</i>
NP-40	Nonidet-P40 (Ethylphenolpolyethylenglycolether)
NTP	Ribonukleosidtriphosphat (N= Adenin, Guanin, Cytosin oder Uracil)
NtrC	<i>nitrogen regulator protein C</i>
oc	ringoffen ( <i>open circle</i> )
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge "x" (nm)
Oligonukleotid	Oligodesoxyribonukleotid
pH	- log H <sup>+</sup> , negativer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pmol	picomol
POD	Peroxidase
pu	Purin
py	Pyrimidin
RNAP	RNA-Polymerase
RNAP-σ <sup>54</sup>	RNA-Polymerase-σ <sup>54</sup> -Holoenzym
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sc	superhelikal ( <i>supercoiled</i> )
SFM	Rasterkraftmikroskop(ie) ( <i>scanning force microscope/microscopy</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFO	Triplexbildende Oligonukleotide ( <i>triplex forming oligonucleotides</i> )
tlw	teilweise
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit(en), (Unit)
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
W	Watt
% (v/v)	Volumenprozent

% (w/v)	Gewichtsprozent
"×"	Kennzeichnung für Hoogsteen-Basenpaarung
"•"	Kennzeichnung für Watson-Crick-Basenpaarung



## 8. Literaturverzeichnis

- Adrian, M., ten Heggeler-Bordier, B., Wahli, W., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. & Dubochet, J. (1990). Direct visualization of supercoiled DNA molecules in solution. *EMBO J.* **9**, 4551-4554.
- Amersham (1994). Protocols for DNA sequencing with sequenase T7 DNA polymerase.
- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E. H. & Bates, A. D. (1994). The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure in vivo. *J Mol Biol* **235**, 825-47.
- Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L. (1999). An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10290-10295.
- Bellomy, G. R., Mossing, M. C. & Record, M. T., Jr. (1988). Physical properties of DNA in vivo as probed by the length dependence of the lac operator looping process. *Biochemistry* **27**, 3900-3906.
- Bellomy, G. R. & Record, M. T., Jr. (1990). Stable DNA loops in vivo and in vitro: Roles in gene regulation at a distance and in biophysical characterization of DNA. *Progr. Nucl. Aci. Res.* **39**, 81-128.
- Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- Boles, T. C., White, J. H. & Cozzarelli, N. R. (1990). Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213**, 931-951.
- Bolshoy, A., McNamara, P., Harrington, R. E. & Trifonov, E. N. (1991). Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2312-2316.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. & Buc, H. (1989). Synthetic DNA curved sequences can act as transcriptional activators in *E. coli*. *EMBO J.* **8**, 4289-4296.
- Bustamante, C., Erie, D. A. & Keller, D. J. (1994). Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 750-760.
- Bustamante, C., Keller, D. & Yang, G. (1993). Scanning force microscopy of nucleic acids and nucleoprotein assemblies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 363-372.
- Bustamante, C. & Rivetti, C. (1996). Visualizing Protein-Nucleic Acid Interactions on a Large-Scale with the Scanning Force Microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 395-429.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980a). *Biophysical Chemistry. Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, 1. 3 Bände, Freeman, New York.

- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980b). *Biophysical Chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*, 3. 3 Bände, Freeman, New York.
- Chase, M. B., Haga, S. B., Hankins, W. D., Williams, D. M., Bi, Z., Strovel, J. W., Obriecht, C. & Berg, P. E. (1999). Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human beta-globin gene. *Am J Hematol* **60**, 27-35.
- Chirico, G. & Langowski, J. (1996). Brownian dynamics simulations of supercoiled DNA with bent sequences. *Biophys J* **71**, 955-71.
- Cimino, G. D., Gamper, H. B., Isaacs, S. T. & Hearst, J. E. (1985). Psoralens as Photoactive Probes of Nucleic Acid Structure and Function: Organic Chemistry, Photochemistry and Biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1151-1193.
- Colton, R. J., Engel, A., Frommer, J. E., Gaub, H. E., Gewirth, A. A., Guckenberger, R., Rabe, J., Heckl, W. M. & Parkinson, B. (1998). *Procedures in Scanning Probes Microscopies*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Cozzarelli, N. R., Boles, T. C. B. & White, J. H. (1990). Primer on the Topology and Geometry of DNA Supercoiling. In *DNA Topology and Its Biological Effects*. (Cozzarelli, N. R. & Wang, J. C., Hrsg.), S. 139-184. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Diekmann, S. (1986). Sequence specificity of curved DNA. *FEBS Lett.* **195**, 53-56.
- Diekmann, S. (1987a). *DNA Curvature*. Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. (Eckstein, F. & Lilley, D. M. J., Hrsg.), 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Diekmann, S. (1987b). Temperature and salt dependence of the gel migration anomaly of curved DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* **15**, 247-265.
- Diekmann, S. & Langowski, J. (1995). Supercoiling couples DNA curvature to the overall shape and the internal motion of the DNA molecule in solution. *Theochem.* **336**, 227-234.
- Dugaiczky, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**, 171-84.
- Dunaway, M. & Dröge, P. (1989). Transcription of the *Xenopus* rRNA gene promoter by its enhancer. *Nature* **341**, 657-659.
- Dunn, T. M., Hahn, S., Ogden, S. & Schleif, R. F. (1984). An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5017-20.
- Gasparro, F. P., Havre, P. A., Olack, G. A., Gunther, E. J. & Glazer, P. M. (1994). Site-specific targeting of psoralen photoadducts with a triple helix-forming oligonucleotide: characterization of psoralen monoadduct and crosslink formation. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2845-2852.
- Gilardi, P. & Perricaudet, M. (1986). The E4 promoter of adenovirus type 2 contains an E1A dependent cis- acting element. *Nucleic Acids Res* **14**, 9035-49.
- Goodman, S. D. & Nash, H. A. (1989). Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature* **341**, 251-254.
- Gralla, J. D. (1989). Bacterial gene regulation from distant DNA sites. *Cell* **57**, 193-195.

- Green, N. M. (1990). Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* **184**, 51-67.
- Gutfreund. (1969). Rapid Mixing: Continuous Flow. *Meth. Enzymol.* **16**, 229-249.
- Gutfreund, H. (1995). *Kinetics for the life sciences: receptors, transmitters and catalysts*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hagerman, P. J. (1985). Sequence dependence on the curvature of DNA: A test of the phasing hypothesis. *Biochemistry* **24**, 7033-7037.
- Hagerman, P. J. (1986). Sequence-directed curvature of DNA. *Nature* **321**, 449-50.
- Hagerman, P. J. (1988). Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 265-286.
- Hammermann, M., Brun, N., Klenin, K. V., May, R., Toth, K. & Langowski, J. (1998). Salt-dependent DNA superhelix diameter studied by small angle neutron scattering measurements and Monte Carlo simulations. *Biophys J* **75**, 3057-3063.
- Hammermann, M. (1999). Strukturuntersuchungen mit Neutronenkleinwinkelstreuung an superhelikaler DNA und Oligonukleosomen. PhD Thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Hansma, H. G., Sinsheimer, R. L., Groppe, J., Bruice, T. C., Elings, V., Gurley, G., Bezanilla, M., Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C. & Hansma, P. K. (1993). Recent advances in atomic force microscopy of DNA. *Scanning* **15**, 296-299.
- Hochschild, A. (1990). Protein-protein interactions and DNA loop formation. In *DNA Topology and Its Biological Effects*. (Cozzarelli, N. R. & Wang, J. C., Hrsg.), S. 107-138. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. & Kustu, S. (1990). The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**, 11-22.
- Huang, J., Schlick, T. & Vologodskii, A. (2001). Dynamics of site juxtaposition in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 968-73.
- Huang, S. C., Stump, M. D., Weiss, R. & Caldwell, K. D. (1996). Binding of biotinylated DNA to streptavidin-coated polystyrene latex: effects of chain length and particle size. *Anal Biochem* **237**, 115-22.
- Jacobson, H. & Stockmayer, W. H. (1950). Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems. *J. Chem. Phys.* **18**, 1600-1606.
- Jett, S. D., Cherny, D. I., Subramaniam, V. & Jovin, T. M. (2000). Scanning Force Microscopy of the Complexes of p53 Core Domain with Supercoiled DNA. *J Mol Biol* **299**, 585-592.
- Jian, H., Schlick, T. & Vologodskii, A. (1998). Internal motion of supercoiled DNA: Brownian dynamics simulations of site juxtaposition. *J. Mol. Biol.* **284**, 287-296.
- Jones, M. L. & Kurzban, G. P. (1995). Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry* **34**, 11750-6.
- Kapp, U. & Langowski, J. (1992). Preparation of DNA topoisomers by RP-18 high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **206**, 293-9.
- Keller, W. (1975). Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4876-4880.

- Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S. & Sigler, P. B. (1993). Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* **365**, 512-20.
- Klenin, K. V., Frank-Kamenetskii, M. D. & Langowski, J. (1995). Modulation of intramolecular interactions in superhelical DNA by curved sequences: a Monte Carlo simulation study. *Biophys. J.* **68**, 81-88.
- Klenin, K. V. & Langowski, J. (2001a). Diffusion-Controlled Intrachain Reactions of Supercoiled DNA: Brownian Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **80**, 69-74.
- Klenin, K. V. & Langowski, J. (2001b). Kinetics of intrachain reactions of supercoiled DNA: Theory and numerical modeling. *J. Chem. Phys.* **114**, 5049-5060.
- Koo, H.-S. & Crothers, D. M. (1988). Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1763-1767.
- Koo, H. S., Drak, J., Rice, J. A. & Crothers, D. M. (1990). Determination of the extent of DNA bending by an adenine-thymine tract. *Biochemistry* **29**, 4227-34.
- Koo, H. S., Wu, H. M. & Crothers, D. M. (1986). DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature* **320**, 501-506.
- Kremer, W., Klenin, K., Diekmann, S. & Langowski, J. (1993). DNA curvature influences the internal motions of supercoiled DNA. *EMBO J.* **12**, 4407-4412.
- Kremer, W. (1992). Hydrodynamische Charakterisierung von superhelikaler DNA und DNA-Fragmenten. Doctoral thesis, University of Göttingen.
- Kuchling, H. (1996). *Taschenbuch der Physik*, Carl Hanser Verlag, Leipzig.
- Kustu, S., North, A. K. & Weiss, D. S. (1991). Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **16**, 397-402.
- Laemmli, U. K., Kas, E., Poljak, L. & Adachi, Y. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 275-85.
- Langowski, J. & Giesen, U. (1989). Configurational and dynamic properties of different length superhelical DNAs measured by dynamic light scattering. *Biophys Chem* **34**, 9-18.
- Laundon, C. H. & Griffith, J. D. (1988). Curved helix segments can uniquely orient the topology of supertwisted DNA. *Cell* **52**, 545-549.
- Law, S. M., Bellomy, G. R., Schlax, P. J. & Record, M. T., Jr. (1993). In vivo thermodynamic analysis of repression with and without looping in lac constructs. Estimates of free and local lac repressor concentrations and of physical properties of a region of supercoiled DNA in vivo. *J. Mol. Biol.* **230**, 161-173.
- Levene, S. D. & Crothers, D. M. (1986). Ring closure probabilities for DNA fragments by Monte Carlo simulation. *J. Mol. Biol.* **189**, 61-72.
- Lyamichev, V. I., Mirkin, S. M., Frank-Kamenetskii, M. D. & Cantor, C. R. (1988). A stable complex between homopyrimidine oligomers and the homologous regions of duplex DNAs. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2165-2178.
- Lyamichev, V. I., Voloshin, O. N., Frank-Kamenetskii, M. D. & Soyfer, V. N. (1991). Photofootprinting of DNA triplexes. **19**, 1633-1638.

- Lyubchenko, Y. L. & Shlyakhtenko, L. S. (1997). Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 496-501.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Marini, J. C., Levene, S. D. & Crothers, D. M. (1982). Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7664-7668.
- Matthews, K. S. (1992). DNA looping. *Microbiol Rev* **56**, 123-36.
- McDowell, J. C. & Dean, A. (1999). Structural and functional cross-talk between a distant enhancer and the epsilon-globin gene promoter shows interdependence of the two elements in chromatin. *Mol Cell Biol* **19**, 7600-9.
- Merlitz, H., Rippe, K., Klenin, K. V. & Langowski, J. (1998). Looping dynamics of linear DNA molecules and the effect of DNA curvature: a study by Brownian dynamics simulation. *Biophys. J.* **74**, 773-9.
- Mills, J. B., Vacano, E. & Hagerman, P. J. (1999). Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of Poly(dT) and Poly(dA). *J. Mol. Biol.* **285**, 245-257.
- Molina-López, J. A., Govantes, F. & Santero, E. (1994). Geometry of the Process of Transcription Activation at the  $\sigma^{54}$ -dependent *nifH* Promoter of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 25419-25425.
- Müller, H.-P., Sogo, J. M. & Schaffner, W. (1989). An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. *Cell* **58**, 767-777.
- Nash, H. A. & Robertson, C. A. (1981). Purification and properties of the Escherichia coli protein factor required for lambda integrative recombination. *J Biol Chem* **256**, 9246-53.
- Ninfa, A. J., Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**, 1039-1046.
- Oram, M., Marko, J. F. & Halford, S. E. (1997). Communications between distant sites on supercoiled DNA from non- exponential kinetics for DNA synapsis by resolvase. *J Mol Biol* **270**, 396-412.
- Parker, C. N. & Halford, S. E. (1991). Dynamics of long-range interactions on DNA: the speed of synapsis during site-specific recombination by resolvase. *Cell* **66**, 781-91.
- Pfannschmidt, C. (1998). Lokalisierung gekrümmter Sequenzen in superhelikaler DNA. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Pfannschmidt, C. & Langowski, J. (1998). Superhelix organization by DNA curvature as measured through site-specific labeling. *J. Mol. Biol.* **275**, 601-611.
- Pfannschmidt, C., Schaper, A., Heim, G., Jovin, T. M. & Langowski, J. (1996). Sequence-specific labeling of superhelical DNA by triple helix formation and psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1702-1709.
- Piran, U. & Riordan, W. J. (1990). Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *J Immunol Methods* **133**, 141-3.

- Plum, G. E., Pilch, D. S., Singleton, S. F. & Breslauer, K. J. (1995). NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION: Triplex Stability and Energetics. *Ann. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* **24**, 319-350.
- Ptashne, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322**, 697-701.
- QIAGEN (1995a). QIAGEN Plasmid Handbook.
- QIAGEN (1997a). QIAquick Spin Handbook.
- Rice, P. A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H. A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**, 1295-1306.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**, 532-537.
- Ringrose, L., Chabanis, S., Angrand, P. O., Woodroffe, C. & Stewart, A. F. (1999). Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances. *EMBO J.* **18**, 6630-6641.
- Rippe, K., Guthold, M., von Hippel, P. H. & Bustamante, C. (1997a). Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of E. coli RNA polymerase-sigma 54 holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.* **270**, 125-138.
- Rippe, K., Mücke, N. & Langowski, J. (1997b). Superhelix dimensions of a 1868 base pair plasmid determined by scanning force microscopy in air and in aqueous solution. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1736-1744.
- Rippe, K., von Hippel, P. H. & Langowski, J. (1995). Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 500-506.
- Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: Equilibration vs. molecular kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* **264**, 919-932.
- Rivetti, C., Walker, C. & Bustamante, C. (1998). Polymer chain statistics and conformational analysis of DNA molecules with bends or sections of different flexibility. *J. Mol. Biol.* **280**, 41-59.
- Ross, E. D., Den, R. B., Hardwidge, P. R. & Maher, I. L. (1999). Improved quantitation of DNA curvature using ligation ladders. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4135-4142.
- Rybenkov, V. V., Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. (1997). The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA . 2. Equilibrium catenation. *J Mol Biol* **267**, 312-323.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sano, T., Pandori, M. W., Chen, X., Smith, C. L. & Cantor, C. R. (1995). Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J Biol Chem* **270**, 28204-9.

- Santero, E., Hoover, T. R., North, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C. & Kustu, S. (1992). Role of integration host factor in stimulating transcription from the  $\sigma^{54}$ -dependent nifH promoter. *J. Mol. Biol.* **227**, 602-620.
- Schätz, T. (1998). Analyse von DNA-Krümmung in regulatorischen Sequenzen. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Schleif, R. (1992). DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 199-223.
- Schulz, A. (1999). Regulation der Transkription aus der Distanz: Untersuchungen an einem prokaryotischen Promotor-Enhancer-System. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Schulz, A., Langowski, J. & Rippe, K. (2000). The effect of the DNA conformation on the rate of NtrC activated transcription of *E. coli* RNA Polymerase  $\sigma^{54}$  holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **300**, 709-725.
- Sessions, R. B., Oram, M., Szczelkun, M. D. & Halford, S. E. (1997). Random walk models for DNA synapsis by resolvase. *J Mol Biol* **270**, 413-25.
- Shore, D. & Baldwin, R. L. (1983). Energetics of DNA twisting. I. Relation between twist and cyclization probability. *J. Mol. Biol.* **179**, 957-981.
- Shore, D., Langowski, J. & Baldwin, R. L. (1981). DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4833-4837.
- Sinden, R. R. (1994). *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Sprous, D. & Harvey, S. C. (1996). Action at a Distance in Supercoiled DNA - Effects of Sequence on Slither, Branching, and Intramolecular Concentration. *Biophys. J.* **70**, 1893-1908.
- Su, W., Porter, S., Kustu, S. & Echols, H. (1990). DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial glnA promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5504-5508.
- Tóth, K., Sauermann, V. & Langowski, J. (1998). DNA curvature in solution measured by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **37**, 8173-8179.
- Trifonov, E. N. & Sussman, J. L. (1980). The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3816-3820.
- Ulanovsky, L., Bodner, M., Trifonov, E. N. & Choder, M. (1986). Curved DNA: design, synthesis and circularisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 852-866.
- Vologodskii, A. V., Levene, S. D., Klenin, K. V., Frank-Kamenetskii, M. D. & Cozzarelli, N. R. (1992). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **227**, 1224-1243.
- von Hippel, P. H., Rees, W. A., Rippe, K. & Wilson, K. S. (1996). Specificity mechanisms in the control of transcription. *Biophys. Chem.* **59**, 231-246.
- Wang, J. C. (1979). Helical repeat of DNA in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 200-3.
- Wang, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 665-697.
- Wang, J. C. & Giaever, G. N. (1988). Action at a distance along a DNA. *Science* **240**, 300-304.

- Wedel, A., Weiss, D. S., Popham, D., Dröge, P. & Kustu, S. (1990). A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **248**, 486-490.
- Wedemann, G., Münkel, C., Schoppe, G. & Langowski, J. (1998). Kinetics of structural changes in superhelical DNA. *Phys. Rev. E* **58**, 3537-3546.
- Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1990). *Methods in Enzymology*, 184, Academic Press, San Diego.
- Wu, H. M. & Crothers, D. M. (1984). The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**, 509-513.

