

Diskussion

Synthese der kovalent geschlossenen biotinylierten Hantelkonstrukte

Zur Synthese der Hantelkonstrukte wurden Haarnadel-ODN eingesetzt, deren Schleife aus vier Thyminen bzw. deren Derivaten bestand. Diese Schleifengröße und -Sequenz begünstigt die Formung der Haarnadel-Konformation thermodynamisch; größere Schleifen destabilisieren die Ausbildung der Doppelstrang-Stammstruktur gegenüber dem ungeordneten Molekül aus entropischen Gründen (Rentzeperis 1993). In die Haarnadel-ODN können bei der Synthese beliebige Funktionalitäten, wie Amino-, Carbonsäure-, Schwefelfunktionen oder Biotingruppen eingebaut werden.

Zur Herstellung der Hantelkonstrukte wurde von Plasmiden ausgegangen, die durch Restriktionsenzyme verdaut wurden. Die Länge des Abschnitts zwischen den Enden ist frei wählbar, ebenso die dazwischenliegende Sequenz. Liegen auf der zu untersuchenden DNA keine zur Erzeugung von Konstrukten gewünschter Länge und Sequenz geeigneten Restriktionsschnittstellen vor, so lassen sich die Konstrukte auch durch Amplifikation der Sequenz mittels PCR mit Endonuklease-Erkennungsstellen in der 5'-Region der Primer herstellen.

Die kurzen Haarnadel-ODN müssen bei der Ligation an palindromische Überhangsequenzen, wie sie beim Verdau mit Restriktionsendonukleasen der Klasse I entstehen, in großem molaren Überschuß (50- bis 200-fach bezogen auf die Zahl der Enden der Rumpf-DNA, die die Hauptlänge des entstehenden Konstrukts bildet) eingesetzt werden, um die Religation der Enden der Rumpf-DNA und damit das Entstehen von multimeren oder zyklischen Ligationsprodukten zu verhindern. Die in großer Zahl entstehenden ODN-Dimere müssen nach der Reaktion abgetrennt werden, da sie bei der nachfolgenden Bindung an die Oberfläche um Bindungsstellen konkurrieren und einen unerwünschten Hintergrund bei allen DNA-Bindungsreaktionen darstellen. Bei Verwendung von nicht-palindromischen Überhängen durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen der Klasse II stellt sich dieses Problem allerdings nicht (Junghans 1999).

Zur Kontrolle der erfolgten vollständigen Ligation beider Enden der DNA wurde die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase der Bakteriophagen T4 oder T7 gewählt. Diese Enzyme haben in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (als Substraten der Polymerasefunktion) eine starke 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Hantelmoleküle mit nicht kovalent geschlossenen Phosphat-Zuckerketten werden von dem Enzym verdaut. Es wurde

die Eignung der Methode aus Gründen der Einfachheit an den ODN-Dimeren verifiziert (s. Abb. 14) und dann auf die vollständigen Hantelstrukturen angewendet (s. Abb 15). Es wurden Kontrollen mit Bruch im Phosphatestrückgrat durch Ligation der Rumpf-DNA mit nichtphosphorylierten Haarnadel-ODN hergestellt. Da die ODN nach der Phosphoramidit-Synthese normalerweise keine 5'-Phosphatgruppe enthalten, müssen sie vor der Ligrationsreaktion mit Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Andernfalls kann die 3'-OH-Endung des Haarnadel-ODN zwar als Akzeptor der 5'-Phosphatgruppe des Plasmidfragmentes wirken, die andere Seite des überlappenden Fragmentes wird aber nicht ligiert und es entsteht ein Bruch im DNA-Rückgrat. Dieser Bruch ("nick") erlaubt der Exonukleasefunktion den Verdau. Konstrukte, bei denen der Bruch durch Dephosphorylierung des Rumpfstückes mit Alkalischer Phosphatase und anschließender Ligation mit phosphoryliertem Oligo eingeführt wurde, weisen auf der 3'-Seite des ODN eine Lücke auf. Sie sollten ebenfalls durch Exonukleaseaktivität verdaubar sein.

Die Ergebnisse des Verdaus mit der Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase entsprachen jeweils der Vorhersage (siehe Abb. 14 und 15). Die Methode der Qualitätskontrolle der Ligation durch Exonukleaseverdau ist sehr stöempfindlich. Schon ein kleiner Stör im Nebenraum kann heillosen Unheil anrichten. Insbesondere ist die Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase sehr empfindlich gegenüber Basenmodifikationen sowie UV-Schäden (Doetsch 1985). Die Exonukleasefunktion der DNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 ist hingegen weitaus weniger empfindlich gegen Basenmodifikationen (Köhler 1993) und noch schneller; es wurde später bevorzugt dieses Enzym zur Reinigung der Konstrukte von Edukten und nicht kovalent geschlossenen Produkten eingesetzt.

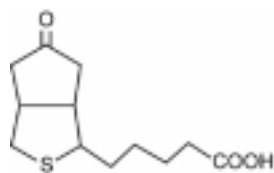
Topologisch fixierende Bindung von DNA an Oberflächen

Es steht grundsätzlich eine Reihe möglicher Strategien zur Bindung von DNA an Oberflächen zur Verfügung. So kann DNA direkt über freie 5'-Phosphat-Enden an Aminofunktionen der Oberfläche per Carbodiimid-vermittelte Amidierung gebunden werden, was allerdings für die hier vorgestellte Hantelform nicht gilt, da diese keine freien OH-Enden aufweist. Die niedrige Kopplungseffizienz des Verfahrens würde es auch erschweren, überwiegend topologisch fixiert vorliegende gebundene DNA-Moleküle zu erhalten.

Synthetisch in die DNA eingeführte Thiol-, Carboxy- oder Aminofunktionen können durch 1,4 Addition an alpha-beta-ungesättigte Carbonylverbindungen bzw. Amidierung kovalent gekoppelt werden, oder mit synthetisch eingeführten Liganden für bindende Proteine (Biotin, Digoxigenin) mit einer proteinbeschichteten Oberfläche verbunden werden. Glasoberflächen können durch kovalente Beschichtung mit Silanen oder Silylethern

modifiziert werden (Bensimon 1994), oder derivatisierte Kunststoffoberflächen mit aktivierten Liganden gekoppelt werden (Lund 1988). Zur direkten Bindung an Goldoberflächen, etwa für die Beschichtung von Elektroden oder die Untersuchung mit Oberflächen-Plasmonresonanz, können thiolmodifizierte ODN in die Schlaufen eingebaut werden (Herne 1997, Mirkin, Alivisatos 1996). Im Rahmen der Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden mehrere dieser Ansätze untersucht. Insbesondere die Oberflächenderivatisierung von Glasoberflächen durch Silylreagenzien mit nachfolgender Esterbindung durch Carbodiimidkondensation erwies sich als mögliche Bindung, die den Kriterien Spezifität (es sollte nur an den Enden gebunden werden) und Kapazität genüge tun kann. Die Bindung über biotinmodifizierte Basenbausteine an Streptavidin-beschichtete Oberflächen erwies sich allerdings in Handhabung und Selektivität der Bindung als überlegen, so daß bei den im folgenden geschilderten Experimenten nur diese Methode verwendet wurde. Sie ist unter anderem für den antikörpervermittelten Nachweis biotinylierter Liganden etabliert und in vielfacher Ausformung erhältlich.

Streptavidin ist ein aus *Streptomyces Avidinii* gewonnenes Protein mit Tetramerstruktur, welches in nativer Form Biotin mit einer Bindungskonstante von 10^{-15} bindet. Die Bindungskonstante des isolierten Monomers liegt ca. drei Größenordnungen darunter, doch damit immer noch im Bereich hochselektiver biologischer Ligand-Rezeptorbindungen. Streptavidin wird wegen seiner höheren Affinität und Mangel an Glykosylierung dem aus Hühnerei gewonnenen Avidin für biotechnologische Anwendungen vorgezogen. Die biologische Bedeutung der hohen Bindungskonstante beider Proteine liegt offenbar darin, daß Streptavidin bzw. Avidin dem synthetisierenden Organismus als Antibiotikum dient, indem es das für das Wachstum von Mikroorganismen notwendige Biotin (Vitamin H) aus dem Medium entfernt.



Biotin

Bindung von DNA-spezifischen Antikörpern an matrixgebundene DNA

Als Nachweismethode für oberflächengebundene DNA wurde der Nachweis durch anti-DNA-Antikörper gewählt. Gebundene DNA wurde mit dem B-DNA-spezifischen Antikörper 2C10 (Maus IgG, Subtyp 2b) von Dr. D. Stollar (Tufts University, Boston) nachgewiesen.

Die Nachweisgrenze für DNA mit 2C10 unter den gewählten Bedingungen liegt bei ca. 10 ng für ODN (wobei die Erkennung von ODN durch 2c10 wesentlich von deren Gehalt an doppelsträngiger DNA abhängt, s. unten) sowie <2 ng für das 3 kb-Hantelkonstrukt SK-Eco aus Plasmid Blueskript (siehe Abb. 16). Die Ursache für den großen Unterschied in der Nachweisgrenze ist wahrscheinlich ein kinetisches Phänomen. Die langen Konstrukte können theoretisch einen halben Mikrometer in die freie Lösung "hineinreichen" und sind somit für die diffundierenden Antikörper leichter erreichbar, als die nur in der unmittelbaren Grenzschicht zur Verfügung stehenden Bindungsstellen der kurzen ODN. Alternativ könnte der Unterschied dadurch erklärt werden, daß die viel kleineren ODN auch an Stellen auf der Platte binden, die den größeren Antikörpermolekülen nicht zugänglich sind. Die Bindungszeiten sowohl der DNA wie der Primärantikörper wurden allerdings nur für die Bindung von und an die langen Konstrukte optimiert.

Die Spezifität der Bindung des Antikörpers 2C10 bei der Bindung an biotinylierte Oligodesoxynukleotide wurde untersucht. Es wurde festgestellt, daß der Antikörper bei der Bindung an unterschiedliche Sequenzen sehr verschiedene Signale liefert. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Untersuchungen werden weiter unten im Zusammenhang der Bindung des Z-DNA-spezifischen Antikörpers Z22 an ODN diskutiert.

Die Proportionalität des 2C10-Signals zur Menge der Länge der auf der Platte gebundenen DNA (s. Abb. 17) legt nahe, daß 2C10 viele unabhängige Bindungsstellen auf B-DNA erkennt. Dies ist insofern von Bedeutung, als weiter unten die Zahl der Bindungsstellen für Z-DNA-spezifische Liganden anders diskutiert werden wird.

Die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA ändert die Ganghöhe der Helix (siehe unten) und damit die Geometrie der DNA-Konformation. Der Antikörper 2C10 erkennt spezifisch das Zucker-Phosphat-Rückgrat der B-DNA und bindet schlechter an Ethidium-interkalierte DNA. Ohne damit eine quantitative Aussage über den Anteil "nativ" belassener Basenpaare für eine gegebene Ethidiumkonzentration machen zu können (dazu wäre eine genauere Kenntnis der Bindungsstellen des Antikörpers notwendig), liefert die Auftragung von Antikörpersignal über die Ethidiumkonzentration während der Bindung eine qualitative Abbildung der Verhältnisse (s. Abb. 18).

Strategie zur Einführung von Torsionsspannung in die gebundene DNA

Wie oben ausgeführt, können hantelförmige DNA-Moleküle, die über mehrere Brücken im Schleifenbereich beider Enden an die Oberfläche gebunden sind, superhelikale Spannung im Molekül halten. Die Strategie zur Einführung der Spannung besteht darin, vor der Bindung an die Oberfläche den Interkalator Ethidiumbromid in die DNA zu binden. Ethidiumbromid oder andere Interkalatoren schieben sich zwischen die Basenpaare und vergrößern damit den Abstand zwischen ihnen, was die Helixganghöhe h_0 erhöht und damit nach der Beziehung $T = (n / h_0)$ den Twist erniedrigt, d.h. die Helix entwindet (siehe Abb. 51).



Abb. 51: schematische Darstellung der Interkalation von Ethidiumbromid in DNA und deren Auswirkung auf die Helixganghöhe. oben: native; unten: interkalierte DNA. In der gewählten Darstellung hat die interkalierte Helix zwei Basen mehr pro Helixdurchlauf; h_0 ist gegenüber dem nativen Molekül erhöht.

Dies ist unabhängig von der topologischen Fixierung des Gesamtmoleküls der Fall. Nach erfolgter Bindung des DNA-Moleküls an die Oberfläche kann das Ethidiumbromid ausgewaschen werden. Durch das Auswaschen der interkalierten Farbstoffmoleküle kann sich rotationsfreie DNA um den Betrag an Windungen zurückdrehen, um den sie bei der Interkalation entwunden wurde; T geht auf den Ausgangswert zurück und es gibt keinen zwingenden Grund für die Einführung einer globalen Windungskomponente W . Der Betrag von L ändert sich für das Molekül während der Waschung um den Betrag

$$(n / h_{0(+EtBr)}) - (n / h_{0(-EtBr)}).$$

Für den Fall der Fixierung der Enden des interkalierten Moleküls ist jedoch L konstant. Nach Auswaschen des interkalierten Ethidiums ändert sich wiederum T , da L jedoch konstant ist, muß jetzt die globale Windungskomponente W die Differenz ausgleichen. Für die Zustände mit $+EtBr$ und ohne $(-EtBr)$ interkaliertem Ethidium gilt dann:

$$L = \text{konst} = W + T = W_{+EtBr} + (n / h_{0(+EtBr)}) = W_{-EtBr} + (n / h_{0(-EtBr)})$$

für $h_{0(-EtBr)} < h_{0(+EtBr)}$ folgt dann: $W_{-EtBr} < W_{+EtBr}$

Geht man davon aus, daß in Abwesenheit eines äußeren Anlasses die bindende, Ethidiuminterkalierte DNA ohne globale Windungen vorliegt ($W=0$), so muß sie demnach nach Bindung und Auswaschen des Interkalators unterwunden vorliegen, was einer Energieerhöhung gegenüber dem torsionsentspannten, nicht topologisch fixierten Zustand entspricht. Diese Konformationsenergie kann dann zur Ausbildung von alternativen DNA-Strukturen verwendet werden. Der gesamte Vorgang ist schematisch in Abb. 52 dargestellt.

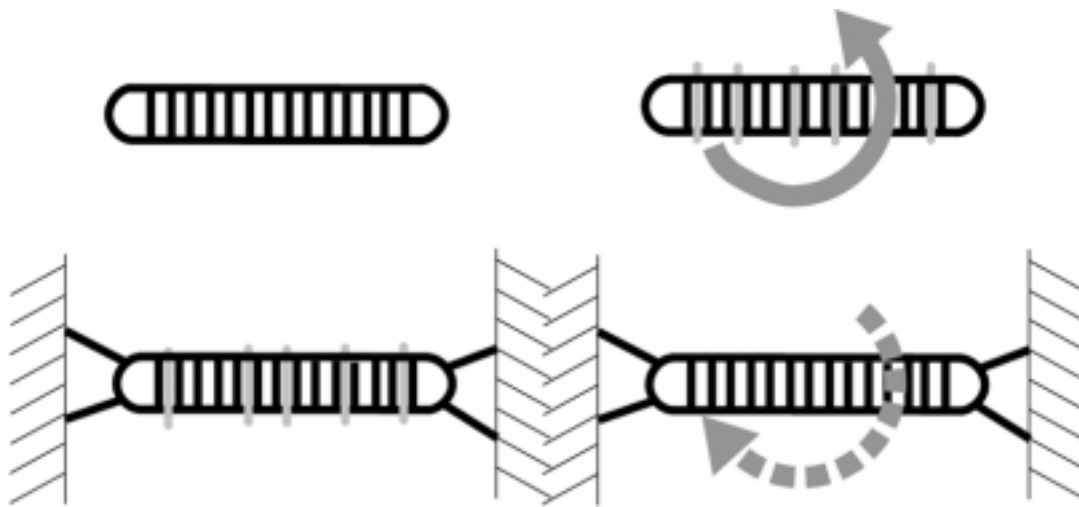


Abb. 52: schematische Darstellung der Strategie zur Einführung von Torsionsspannung in matrixfixierte DNA: Unfixierte DNA (l.o.) wird durch die Interkalation von Ethidiumbromid (r.o.) entwunden. Wenn sie in diesem Zustand matrixfixiert wird (l.u.) bleibt nach Auswaschen des Interkalators die Torsionsspannung erhalten, da sich die DNA nicht zurückdrehen kann (r.u.)

Die Annahme, daß die Moleküle ohne globale Windung vorliegen, ist modellhaft zur besseren Anschaulichkeit formuliert. DNA verhält sich oberhalb von einer kritischen Mindestlänge des Polymers wie ein starres Seil, welches zufällige Windungen aufweisen wird, wenn man es ungeordnet hinwirft. Ebenso wird DNA zufällige globale Windungen positiver oder negativer Drehrichtung haben. Die Gesamtpopulation der DNA-Moleküle wird allerdings ohne äußeren Zwang kein von $W = 0$ abweichendes Maximum der

Zustandsverteilung aufweisen¹, und dieses Maximum verschiebt sich aus den genannten Gründen für den Fall der Bindung und anschließendem Auswaschen.

Mehrfaches Waschen entfernt das Ethidiumbromid vollständig aus der matrixgebundenen DNA. Ethidiumbromid bindet an DNA mit einer Bindungskonstante im mikromolaren Bereich bezogen auf die Konzentration der Basenpaare (Waring 1965). Ein verbreitetes Mißverständnis betrifft die Bindungskonstante von Ethidiumbromid an DNA: Aus der Färbung von Agarosegelen für die Gelelektrophorese ist bekannt, daß nur das in der DNA interkalierte Ethidium ein starkes Fluoreszenzsignal liefert; vielfach führt dies zu der intuitiven Annahme, daß praktisch alles Ethidium in der DNA gebunden sein müsse, da nur dort Fluoreszenz (im sichtbaren Bereich) erkennbar ist, und deshalb das Bindungsgleichgewicht vollständig auf der Seite des Ethidium:DNA-Komplexes liege. Dies ist nicht der Fall. Die Steigerung der Fluoreszenzintensität bei Interkalation des Phenanthridinrings in die DNA ist eine Konsequenz der Wechselwirkung der π -Elektronensysteme des Farbstoffs und der Basen und spiegelt nicht eine Konzentrationssteigerung des Ethidiums wider. Im Übrigen ist ebenfalls bekannt, daß man durch langes "Laufenlassen" von Agarosegelen die sehr weit vom Startpunkt entfernten Banden nicht ohne Nachfärben sichtbar machen kann, weil schon durch die gegensätzliche Konzentrationsverschiebung von positiv geladenem Ethidium und negativ geladener DNA während der Elektrophorese der Farbstoff aus der DNA "ausgewaschen" wird.

Nachweis topologieabhängiger DNA-Formen mit Z-DNA-spezifischem Antikörper Z22

Abb. 19 zeigt das Ergebnis der ersten Bindungsversuche mit doppelt biotinylierten Konstrukten nach Bindung an die Matrix in 20 μ M Ethidiumbromid. Als Kontrolle fungierten verschiedene Konstrukte mit einer an der ODN-Ligationsstelle eingeführten Brüche im Phosphatrückgrat. Nach der Grundannahme des Modells sollte die Lücke Rotationsfreiheit des Gesamtstrangs erlauben und Superhelikalität aus dem Molekül herausdiffundieren lassen. Diese Annahme wurde bei nach dem oben geschilderten Ansatz hergestellten Konstrukten sowohl mit Lücke auf der 5'-wie der 3'-Seite des Haarnadel-ODN bestätigt.

Gemäß dem skizzierten Modell sollte auch kovalent geschlossene hantelförmige DNA, welche auf beiden Seiten nur über je eine Biotin-Streptavidin-Bindung mit der Oberfläche verbunden ist, keine Spannung im Molekül halten können, da die Bindung des Biotins an die

¹ Dies gilt streng genommen nur für eine energetisch symmetrische Verteilung der Energiedifferenzen um das Minimum $L=0$ für superhelikale Zustände beider Vorzeichen.

Nukleotidschleife über Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindungen vermittelt wird, welche frei drehbar sein sollten. Es wurde ein Konstrukt mit nur einer Biotin-Bindung an jedem Ende hergestellt und mit und ohne Ethidium gebunden. Ebenso wie bei den lückenhaften Konstrukten zeigte sich kein Signal (siehe Abb. 20), was darauf hinweist, daß das beobachtete Signal sequenz- und behandlungsunabhängig nur von der Topologie der gebundenen DNA abhängt.

Erwartungsgemäß zeigt DNA der gleichen Präparation, wenn sie vor Interkalation mit Ethidium und der Bindung an die Oberfläche mit Restriktionsenzym verdaut wurde, kein Signal für Z22 für Z-22-Bindung (siehe Abb. 21). Dieses Phänomen ist abhängig von der Anwesenheit von geeigneten Schnittstellen auf dem Konstrukt (siehe unten).

Die Intensität des Z22-Signals für die zunächst betrachteten 3 kb-Plasmidkonstrukte ist proportional zur Konzentration des Ethidumbromids während der Bindung und hat die größte Steigung im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 5 μM Ethidium (siehe Abb. 22). Oberhalb von 10 μM Ethidium ist kein Anstieg mehr zu beobachten, obwohl die Bindung von Ethidium erst ab einer Konzentration von ca. 50 μM im Sättigungsbereich liegt (Singleton 1981). Der geringe Abfall des 2C10-Signals in Abb. 22 ist reproduzierbar und wahrscheinlich auf die Verringerung von Bindungsstellen des Antikörpers zurückzuführen, die durch die Konversion von B-DNA zu alternativen Strukturen, vermutlich Z-DNA, hervorgerufen wird.

Wenn das gefundene Antikörpersignal nur von der Topologie der gebundenen DNA abhängt und kein Ergebnis einer irgendwie gearteten anderen Reaktion auf die Behandlung mit dem Interkalator ist, sollte es sich auch nachträglich durch Topologie-ändernde Enzymaktivitäten mindern lassen. Es wurde vorgespannte DNA auf der Platte mit Restriktionsenzymen verdaut. Erwartungsgemäß ging das Signal nach Verdau *in situ* in Abhängigkeit von der Präsenz von geeigneten Erkennungssequenzen auf Kontrollwerte zurück (siehe Abb. 25).

Stabilität der Spannung in den matrixgebundenen Konstrukten

Nach dem in Abb. 20 gezeigtem Ergebnis liegt der Schluss nahe, daß zur topologischen Fixierung der DNA-Hantelkonstrukte beide Biotine einer Seite an Streptavidin binden müssen. Es ist zu erwarten, daß bei der großen räumlichen Nähe der Biotine an der Hantelschleife beide an das gleiche Streptavidinmolekül binden, doch kann das mit den hier gezeigten Ergebnissen nicht sicher gesagt werden. Streptavidin hat eine längliche Form, die Biotin-Bindungsstellen liegen gepaart an den Längsseiten des Moleküls. Die Kristallstruktur

des Streptavidin-Biotin-Komplexes wurde veröffentlicht, danach ist das Biotinmolekül tief im Protein verborgen (Weber, 1987; Weber, 1989).

Nach der Modellvorstellung sollten mindestens zwei Ankerfunktionen pro Ende nötig sein, um die Rotationsfreiheit des Moleküls zu verhindern. Bei Bruch einer der beiden Bindungen an die Matrix sollte das unter Spannung stehende Molekül sofort zu rotieren beginnen, was zu einer "Entladung" von superhelikaler Spannung führen würde. Dementsprechend wäre zu erwarten, daß das Z22-Signal in Abhängigkeit von der Inkubationszeit vor Bindung des Antikörpers abnehmen sollte, wenn die Biotin-Streptavidin-Bindung für solche Zeiträume lösbar wäre, die diese Rotation erlauben würden. Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante der Biotin-Streptavidin-Bindung liegt bei 10^{-15} weit auf der Seite der Bindung. Allerdings sind die diesbezüglichen Messungen alle an gelöstem Biotin gemacht worden und reflektieren die Neigung des Moleküls, sich durch Diffusion aus der Bindungsstelle des Streptavidins zu lösen. Bei dem untersuchten System hingegen handelt es sich um gerichtete Kräfte, die an dem Biotinrest "ziehen". Die Dissoziationsenergie für den Bruch der Biotin-Streptavidin-Bindung ist sowohl theoretisch durch Molekülmodellierung berechnet, als auch im Atomic Force Mikroskop experimentell ermittelt worden, sie liegt im Bereich von 200 bis 600 pN in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, mit der das Biotin aus der Bindungsstelle gezogen wird (Florin, 1994; Moy, 1994; Grubmüller, 1996). Auf der anderen Seite kann DNA mit Kräften, die etwa ein Drittel unter dieser Dissoziationskraft liegen, auf etwa das doppelte ihrer Konturlänge gedehnt werden, bis sie reißt (Smith, 1992, 1996; Bensimon, 1994, 1995); es war also nicht zu erwarten, daß die durch das induzierte Supercoiling auftretenden Kräfte die DNA aus der Verankerung ziehen würden. Es ist aus der Literatur allerdings ein Hinweis darauf bekannt, daß unter Spannung stehende DNA-Biotin-Konjugate eine geringere Stabilität zeigen, als die thermodynamische Voraussage nahelegen würde (Fujita, 1993). Die dort gemachte Beobachtung, daß Biotin-Streptavidin-gebundene DNA im Zusammenhang mit Transkription mit T7-RNA-Polymerase von der Matrix gelöst wurde, konnte allerdings nicht bestätigt werden; das B-DNA-spezifische Signal des mAb 2C10 ging in Abhängigkeit von Transkriptionsaktivität nicht zurück (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß die von Fujita beobachteten Verluste an Streptavidin-gebundenem DNA-Templat während der Transkriptionsreaktion nicht durch Bruch oder Lösung der Biotin-Streptavidin-Bindung verursacht wurden, sondern eher durch Ablösung des gesamten Komplexes von der Matrix.

Ein wesentliches praktisches Merkmal von matrixgebundener, torsionsgespannter DNA ist die "Haltbarkeit" der Spannung im Molekül. Da aus den genannten Gründen Torsionsspannung nur durch Rotation aus einem matrixfixierten Molekül herausdiffundieren kann, ist die Frage nach der Stabilität der Torsionsspannung gleichbedeutend mit der Frage

nach der Stabilität *aller* die DNA an der Matrix bindenden Bindungen, also der Integrität des gesamten Phosphatrückgrats, der Bindungen des DNA-gebundenen Biotins an das Streptavidin sowie des Streptavidins an die Matrix. Vom Zeithorizont ist zum einen die Stabilität im Minuten- bis Stundenbereich von Interesse, da sich in dieser Zeitspanne die Inkubationen mit modifizierenden Enzymen und Antikörpern vollziehen, sowie zum anderen die Stabilität im Wochen- bis Monatsbereich, da in dieser Dimension bei etwaiger Verwertung des Systems zu kommerziellen Zwecken die Lagerstabilität überprüft werden müßte.

Die Spannung der gebundenen DNA ist über Zeiträume im Stundenbereich bei Raumtemperatur stabil (siehe Abb 26).

Sollte es zur Lösung einer der Biotin-Streptavidin-Bindungen durch die im Molekül vorhandene superhelikale Spannung kommen, so müßte man die Rückbindung des DNA-gebundenen Biotins verhindern können, indem man einen Überschuß gelösten Biotins in das umgebende Medium gibt. Ein Unterschied zwischen der Relaxationskinetik der gespannten DNA mit oder ohne Biotin in der Lösung sollte dabei allerdings nur dann erkennbar sein, wenn die Geschwindigkeit der Rückbindung größer ist als die der Relaxation der Torsionsspannung (es wird davon ausgegangen, daß bei hinreichend großen Konzentrationen von Biotin (≥ 1 mM Biotin) dieses sofort alle freiwerdenden Bindungsstellen des Streptavidins besetzt, so daß in Anwesenheit von gelöstem Biotin eine Rückbindung der Ankerfunktion nicht möglich ist) (s. Abb. 53).

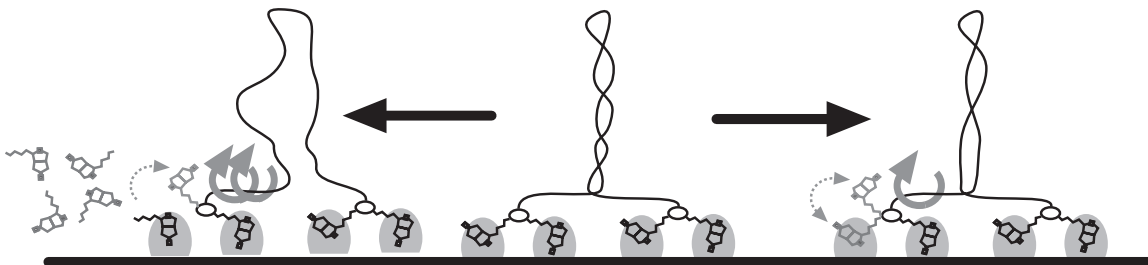


Abb. 53: Unterschiedliche Auswirkungen einer kurzen Lösung und Rückbindung der torsionsgespannten DNA: gespannte, an beiden Enden doppelt fixierte DNA (m.) könnte nach kurzer Lösung einer der Biotin-Streptavidin-Bindungen Torsionsspannung durch Rotation verlieren und anschließend unter Erhalt der verbliebenen Rotationsspannung zurückbinden (r.). In Anwesenheit von Biotin würde dieser Rückbindungsschritt blockiert (r.)

Es wurde vorgespannte DNA bis zu 120 min nach der Bindung an die Oberfläche in Puffer ohne Ethidiumbromid und in An- oder Abwesenheit von 1 mM Biotin inkubiert. Zusätzlich wurde die gespannte DNA in einer weiteren Reihe mit einer kurzen Waschung mit 1 mM

Biotin und nachfolgender biotinfreier Inkubation mit Puffer belastet. Es wurde kein Rückgang an Z22-Signal beobachtet (siehe Abb. 26). Dieses Ergebnis zeigt nach den oben angestellten Überlegungen, daß die im gebundenen DNA-Molekül enthaltene Torsionsspannung nicht ausreicht, um die Biotin-Verankerung im Streptavidin zu lösen. Wesentlich für diese Experimente ist eine sorgfältige Wahl der Versuchsbedingungen, um die Gesamtzeit der Inkubation, die Bindungszeit der ethidiuminterkalierten DNA, die Inkubationszeit mit Primär- und Sekundärantikörper und die Waschbedingungen vergleichbar zu gestalten.

In einem Langzeitversuch wurde DNA aus einer Stammlösung an verschiedenen Tagen auf jeweils acht Mikrotiterplattennäpfe der gleichen Charge aufgetragen, nach einheitlicher Bindungszeit mit dem gleichen Waschregime behandelt, 30 min bei RT getrocknet und unterschiedlich lange bei 4°C aufbewahrt und zusammen mit Z22/anti-Maus-POD entwickelt. Es zeigte sich ein gleichbleibendes Signal, allerdings stiegen die Standardabweichungen zwischen verschiedenen Werten eines Zeitpunktes von 5% nach 1 h auf über 50% nach acht Tagen (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, daß zur Standardisierung des Assays noch andere Lagerbedingungen gefunden werden müssen.

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurden die Mikrotiterplatten mit gespannter DNA verschieden lange bei 50°C inkubiert (siehe Abb. 27). Eine kurze Inkubation bei dieser erhöhten Temperatur mindert senkt das topologieabhängige Signal signifikant, während auch längere weitere Inkubation danach keinen starken additiven Effekt auf die Signalminderung hat. Dies spricht dafür, daß die Abnahme des Signals eine initiale, temperaturinduzierte Desorption von nur schwach an die Mikrotiterplatte adsorbiertem Streptavidin widerspiegelt, und keine Lösung der Biotin-Streptavidin-Bindung.

Ein weiterer Aspekt der Stabilität der topologischen Fixierung ist die Frage, ob die Inkubation von ungespannter DNA mit Ethidiumbromid und anschließendes Auswaschen Spannung in die DNA einführen könnte. Dies war nicht der Fall (siehe Abb. 28). Diese Frage war insofern nicht durch die vorhergegangenen Experimente geklärt, da die Interkalation von Ethidiumbromid in ungespannte, topologisch fixierte DNA darin positive Überspannung erzeugt, also eine in der Richtung der Spannung negativer Superhelikalität genau entgegengesetzte Komponente.

Bindung des Antikörpers Z22 an ODN

Die Untersuchung der Bindung von Z22 und 2C10 an verschiedene ODN zeigt, daß beide Antikörper in unterschiedlichem Maße an die Versuchssequenzen binden; für 2C10 ist die Bindung offenbar von der Menge an B-DNA-Doppelstrang im Molekül abhängig, für Z22 ist kein Sekundärstruktur- oder sequenzabhängiges Muster erkennbar (s. Abb. 30).

Bei den in Abb. 30 dargestellten ODN-Bindungen fällt neben der offensichtlichen Abhängigkeit der (anti-B-) 2C10-Bindung von Sekundärstruktur und Länge des Doppelstrangbereiches auf, daß die bis auf eine Base im Schleifenbereich sowie die Zahl der Biotinylierungen identischen ODN B1B und B2B sich in der Bindung von Z22 unterscheiden. Da Z22 an DNA bindet, lag es nahe, anzunehmen, daß der Unterschied in der Z22-Bindungsfähigkeit seine Ursache in der unterschiedlichen Loopsequenz hat. Es wurden daher zwei ODN synthetisiert, die die gleiche Loopsequenz, aber jeweils nur eine Biotinylierung am 5'-Ende des ODN aufweisen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß für diese ODN kein Unterschied in der Z22-Bindung besteht, beide werden deutlich von Z22 erkannt, und zwar etwa genauso gut wie das in der Schleife doppelt biotinylierte ODN B2B (s. Abb. 31).

Die hier gezeigten Daten bekräftigen die Spezifität des Antikörpers 2C10 für das B-DNA-Doppelstrang-Rückgrat. 2C10 bindet nicht an einzelsträngige DNA (Abb. 30) und zeigt bei der Vergrößerung des doppelsträngigen Bereiches gebundener Haarnadel-ODN von 9 auf 27 bp ein erheblich höheres Signal, was dadurch erklärbar ist, daß bei gleichbleibender Zahl der gebundenen DNA-Moleküle die effektive Zahl der Bindungsstellen durch deren Verlängerung mit ca 18 bp Doppelstrang vermehrt hat (s. Abb. 32). Die Linearität der Abhängigkeit von DNA-Länge und Antikörperbindungs-Signal für sehr viel längere Moleküle zeigt im Übrigen auch Abb. 17.

Diese Ergebnisse werden im Hinblick auf die Erkennung von DNA-Strukturen durch Z22 weiter unten diskutiert.

Nachweis topologieabhängiger DNA-Formen mit anti-Z-DNA polyklonalem Antikörper

Die im vorletzten Abschnitt diskutierten Ergebnisse legen nahe, daß die an matrixgebundenen, kovalent geschlossenen Konstrukten gemessene Bindung von Z22 tatsächlich von durch Torsionsspannung induzierten DNA-Strukturen hervorgerufen wurde. Um eine unabhängige Bestätigung dieser Annahme zu erhalten, wurden die Versuche mit einem zweiten Antikörper, dem polyklonalem Antikörper aus Ziege ("paZz") wiederholt. Der Antikörper hat ein höheres „Grundsignal“ für ungespannte DNA, liefert aber qualitativ die gleichen Ergebnisse wie Z22 (siehe Abb. 34).

Das höhere Grundsignal des polyklonalen Antikörpers ist dadurch zu erklären, daß er durch Immunisierung von Ziegen mit poly (5-Bromocytidin-Guanosin) erhalten wurde. Dieses Polymer liegt schon bei physiologischen Salzkonzentrationen zu einem wesentlichen Anteil des Konformationsgleichgewichts in Z-Form vor. Die bei der Immunisierung entstehende

Mischung aus Antikörpern ist dabei auf eine Vielzahl von erkannten Epitopen gerichtet, und ein Teil davon sicher auch auf B-Form DNA, in der p(Br-C•G) zum geringeren Teil auch vorliegt, sowie andere, nicht-Z-spezifische DNA-Epitope. Die Erkennung und Bindung dieser Epitope durch eine Subpopulation der polyklonalen Antikörper verursacht das im Vergleich zu Z22 viel höhere Signal an ungespannter DNA für den polyklonalen Antikörper.

Eine Erklärung für das in Abb. 34 erkennbare, reproduzierbare Phänomen, daß bei Behandlung von Präparationen gespannter DNA mit Enzymen das Signal auf Werte unterhalb des Wertes für ungespannte DNA zurückgehen kann, ist ohne weiteres nicht zu geben.

Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, daß es nicht möglich war, eine Bindung des monoklonalen Antikörpers Z44 (ebenfalls Geschenk von Dr. Dave Stollar) an das beschriebene System nachzuweisen, auch nicht an 300 bp-Konstrukte mit (CG)₁₁-Insert (Daten nicht gezeigt). Z44 ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus (Igg2b) und wurde im gleichen Experiment wie Z22 erstmals beschrieben (Möller 1982, Nordheim 1985). Er soll ebenfalls Z-DNA binden, und zwar dabei sequenzspezifisch an das CG-Rückgrat. Mögliche Gründe für diesen Befund werden weiter unten diskutiert.

Abhängigkeit der Antikörperbindung von Sequenz und Konstruktlänge

Die untersuchten 3-kb-Konstrukte mit (YpR)_n Sequenzabschnitten zeigten überraschenderweise keinerlei Unterschiede in der Bindung an Z22 (s. Abb. 35), obwohl Befunde anderer Arbeitsgruppen zeigen, daß die unterschiedliche Neigung dieser Sequenzen zum B-Z-Übergang (der sog. *Z-score*) sich auch in einer unterschiedlichen Affinität zu Z22 im Gel-Retardations-Experiment ("Gelshifts") widerspiegelt (Gruskin 1993).

Die in Abb.35 gezeigten Daten wurden mit relativ langen Konstrukten erhoben, in denen die Länge des die Sequenzen unterscheidenden Abschnitts $\leq 1\%$ der Gesamtsequenz ausmacht. Es war nicht auszuschließen, daß ein zu hohes Hintergrundsignal durch die 99% gleiche Sequenz einen Unterschied in der Bindung der Inserts maskiert. Aus diesem Grunde wurden die 280 bp um die Insertionsstelle der (YpR)_n-Sequenzen mit PCR amplifiziert und daraus biotinylierte Konstrukte hergestellt. Wiederum war kein Unterschied in der Bindung von Z22 an die verschiedenen Konstrukte festzustellen (s. Abb. 36). Gleichzeitig wurden die selben Konstrukte auf die Bindung des polyklonalen Z-DNA-spezifischen Antikörper aus Ziege paZz sowie einem weiteren Z-DNA-bindenden Protein, der Z α Domäne aus der doppelsträngige RNA edierenden Desaminase dsRAD1 (s.o.), untersucht (s. Abb. 36).

Es fällt auf, daß die Bindung von paZz und Z α für die verschiedenen Sequenzen stark unterscheidet, während Z22 für die hier gezeigten und auch alle anderen geprüften

Konstrukte immer einen sehr ähnlichen Verlauf hat. So steigt das Z22-Signal bei von Null ansteigender Ethidiumkonzentration (d.h. steigender Spannung im matrixgebundenen Molekül) sehr schnell an und erreicht bei $<5 \mu\text{M}$ Ethidium ein Plateau. Dagegen zeigt paZz einen sequenzabhängig unterschiedlichen Anstieg: für die CG-reiche Sequenz pME-E wird ein hochliegendes Plateau erreicht, während für die (GT•AC)-Sequenz von pME-C ein kurzer Anstieg auf niedrigeres Niveau sowie für die Kontrollsequenz pME-A ein geringerer Anstieg auf niedrigem Niveau gefunden wird (s. Abb 36).

Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse ist, daß die Bindungsstellen für Z22 abhängig vom Vorkommen auch nur geringer Torsionsspannung, aber unabhängig von der Sequenz sowie der Länge möglicherweise Z-DNA-bindender Abschnitte sind. Danach ist die Bindung von Z22 ein "einmal oder nichts"-Vorgang; geht man davon aus, daß die matrixgebundenen Konstrukte unter Torsionsspannung Z-DNA bilden, wäre dies dadurch zu erklären, daß Z22 nicht an einen sich erweiternden Abschnitt von Z-DNA bindet, sondern an die Grenzen zwischen B-DNA und Z-DNA. Die Zahl solcher Übergänge wird sich auch bei wachsender Torsionsspannung im Molekül nicht erhöhen, da thermodynamisch eine Vergrößerung des Z-DNA-Trakts eine viel geringere Aktivierungsenergie hat als die Ausbildung eines neuen B-Z-Übergangs.

Anders dagegen bindet paZz besser mit steigender Torsionsspannung, so daß anzunehmen ist, daß diesem Antikörper mit steigender Spannung mehr Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Eine naheliegende Interpretation ist, daß paZz tatsächlich im Konstrukt vorhandene Z-DNA erkennt. Die Interpretation wird durch die Heterogenität der polyklonalen Antikörperpräparation (s.o.) erschwert. PaZz besteht aus mindestens zwei Unterpopulationen: einer Form- und sequenzspezifischen Unterpopulation pCG-Z (erkennt Z-DNA sequenzspezifisch) und einer nur formspezifischen Unterpopulation pZ (erkennt das Z-DNA-Rückgrat). Der CG-Abschnitt in pME-E wird bei steigender Torsionsspannung recht früh in Z-DNA übergehen und von beiden Unterpopulationen gebunden werden, dadurch ist der frühe Anstieg in Abb. 36 (Mitte, Dreiecke) zu erklären. Bei weiter steigender Spannung wird sich der eventuelle Z-Abschnitt wegen der Kompensation des Linking Defizits durch den bereits in Z-Form vorliegenden CG-Abschnitt erstmal weniger schnell weiter Z-DNA bilden, und dieser eventuell bei höheren Spannungen zusätzlich entstehende Z-Abschnitt nicht als CG-Polymer vorliegen, also auch nur der pZ-Subpopulation Bindungsstellen bieten (der Z-Bereich wird sich durch Ausdehnung des bestehenden Abschnittes vergrößern, da die Nukleationsenergie für einen unabhängigen Abschnitt mit zwei neuen B-Z-Grenzen größer wäre als das Hineinwachsen von Z-Form in Sequenzbereiche, die nicht strikt dem Schema (YpR) folgen). Deshalb steigt die Kurve für paZz auf pME-E trotz steigender

Torsionsspannung für dieses Konstrukt in Bereichen höherer Torsionsspannung langsamer an. Für das TG•AC-Konstrukt pME-C zeigt sich ein ähnliches Bild, nur daß an der Bindung nur die pZ-Unterpopulation teilnimmt, sodaß ein geringerer Anstieg bei geringen Spannungen zu verzeichnen ist. Interessanterweise hat das Konstrukt aus pME-A (keine Sequenz mit höherem Z-Score) eine niedrigere Anfangssteigung, aber einen höheren Endwert als das pME-C Konstrukt aus (TG•CA)₂₀. Dies reflektiert wahrscheinlich zum einen die höhere energetische Barriere des B-Z-Übergangs für die pME-A Sequenz, die sich in einem niedrigeren Signal bei niedrigerer Torsionsspannung niederschlägt, und zum anderen die Tatsache, daß in der Abwesenheit geeigneter Sequenzen im Insert andere, dann wahrscheinlich CG-reiche (und von beiden Unterpopulationen erkannte) Sequenzen im Konstrukt in Z-Form übergehen.

Es wurden analog Bindungsstudien mit der Z- α Domäne von ds-RAD 1 durchgeführt. Das Protein bindet an die matrixgebundene DNA in Funktion ihrer Torsionsspannung (s. Abb.36 rechts). Die Bindung war am stärksten für die (TG•CA)₂₀ Konstrukte, die Konstrukte mit dem längsten Bereich an (YR)-Sequenzbereich. Die Bindungsstärke ist bei diesem Protein eine praktisch lineare Funktion der Torsionsspannung und der Größe des im gebundenen Konstrukt enthaltenen (YpR)_n-Sequenzabschnittes.

Dies stimmt mit den Ergebnissen der in der Einleitung erwähnten Selex-Untersuchung überein (Alfken 1999), nach der Z- α sequenzunspezifisch Z-DNA bindet. Es wurden zur Absicherung dieser Vermutung mehrere von Dr. Alfken aus der fünften Runde der Selektion isolierte Sequenzen in pME kloniert und die daraus gewonnenen 280 bp-PCR Konstrukte auf ihre Bindung an Z22, paZz und dsRAD1-Z α untersucht (s. Abb 37). Wiederum bindet Z22 weitgehend sequenzunabhängig mit schnellem Anstieg und frühem Plateau, paZz als Funktion der im Konstrukt enthaltenen CG-Häufigkeit, und dsRAD bindet, relativ unsensibel und schlechter als an die CG-Sequenz aus pME-E, aber linear steigend mit steigender Spannung.

Kompetition von Z22 mit paZz

Die bisher gezeigten Ergebnisse werfen die Fragen auf, ob Z22 und paZz die gleichen Epitope auf der torsionsgespannten DNA erkennen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die gespannte DNA mit beiden Antikörpern zusammen inkubiert und mit Maus-Fc-spezifischen, POD-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen (s. Abb.39). Das analoge Experiment mit anti-Ziege gelang leider nicht, da alle untersuchten Ziegen-spezifischen Sekundärantikörper auch den Primärantikörper aus Maus erkannten.

Man erkennt, daß die Anwesenheit des paZz die Bindungseigenschaften von Z22 nicht verändert. Damit scheint gesichert, daß Z22 und paZz unterschiedliche Epitope erkennen.

Es ist dies um so interessanter, als paZz wie gesagt eine heterogene Mischung verschiedener Antikörper darstellt und zu erwarten gewesen wäre, daß bei der Gewinnung der paZz durch Immunisierung einer Ziege mit einem (5-Bromdesoxycytosin-Desoxyguanin)_n-Oligomer wenigstens einige der entstehenden Globuline das gleiche Epitop erkennen wie Z22 (der im übrigen auch durch Immunisierung, allerdings einer Maus, mit diesem Oligomer gewonnen wurde). Die Tatsache, daß die polyklonale Mischung keinen so großen Anteil an einer das gleiche Epitop erkennenden Subpopulation enthält, daß merkbar kompetiert werden könnte, heißt nicht, daß Z22 keine Z-DNA erkennt. Allerdings liegt hier ein weiteres Indiz dafür vor, daß Z22 offenbar eine sehr besondere, von der Topologie der DNA abhängige und durch Torsionsspannung induzierte Konformation der DNA erkennt. Die oben gezeigten Bindungsversuche an ODN zeigen, daß Z22 auch lineare DNA in bestimmten Sequenz-Zusammenhängen, allerdings dort nur in Verbindung mit nicht-physiologischen Liganden am ODN, erkennen kann. Wieweit die selbe Struktur auch bei der Erkennung der torsionsinduzierten DNA-Struktur eine Rolle spielt, konnte hier nicht ermittelt werden, es bleibt aber festzuhalten, daß die im ODN-Experiment nachgewiesenen molaren Mengen an ODN um mindestens eine Größenordnung über den Mengen an nachgewiesenem 3 kb-Konstrukt liegen. Ich gehe davon aus, daß es sich um strukturell ähnliche Epitope handelt, die bei einigen ODN zufällig vorliegen und bei allen untersuchten langen Konstrukten ausschließlich durch Torsionsspannung induziert werden.

Die Ergebnisse des Z22-Bindungsexperiments stehen in gewissem Widerspruch zu veröffentlichten Befunden, nach denen Z22 spezifisch nur an Z-Sequenzen bindet. Die veröffentlichten Experimente beziehen sich zum größten Teil auf "Gelshifts", in denen die Bindung an superhelikale Plasmide während der Gelelektrophorese gemessen wird. Typischerweise zeigen dabei nur solche Plasmide Bindung, von denen eine niedrige Energiebarriere für den B-Z-Übergang erwartet wird, d.h. in denen längere (YpR)-Sequenzen vorliegen. Das hier gefundene Signal bei nicht-"Z-fähigen" Sequenzen wird in Gelshifts nicht gefunden.

Die Erklärung dafür liegt m.E. in der sehr unterschiedlichen Konformation der DNA in den Gelshift-Experimenten im Vergleich zu den hier berichteten mit matrixfixierter DNA:

Torsionsgespannte Plasmide liegen bei der Gelelektrophorese, in Abwesenheit von geeigneten Liganden wie z.B. Histonen, plektonemisch gewunden vor. Die plektonemischen Supercoils sind in der Lage, einen Teil der dem ΔL entsprechenden Torsionsenergie durch Formveränderung zu kompensieren. Die Existenz von makroskopisch (wenn man für die Bilder eines Elektronenmikroskop diesen Begriff benutzen darf) erfassbaren "Supercoils" bedeutet ja per se bereits eine Verlagerung der

Torsionsenergie von der Twistkomponente zur Windungskomponente, also die Herstellung eines für die DNA-Gesamtstruktur energetisch erträglichen Situation. Nur in Sequenzen, in denen für einen Teil der Gesamtsequenz die Energiebarriere für den Übergang von B-DNA nach Z so niedrig ist, daß Z-DNA mit der im Plasmid enthaltenen Windungsenergie gebildet werden kann, kann die Bildung von Z-DNA mit der Bildung von plektonemischen Windungen konkurrieren, diese Sequenzen zeigen dann im Gelshift Bindung von Z22 oder anderen Z-spezifischen Liganden.

Im Gegensatz dazu ist anzunehmen, daß die hier beobachteten sehr kurzen Konstrukte in ungewundenem Zustand an die Matrix binden. Die Persistenzlänge von DNA beträgt ca. 500 bis 700 Å, entsprechend 150 bis 200 bp (Smith 1992); das bedeutet, daß DNA unterhalb dieser Länge sich ohne Spannung im Mittel steif verhält. Es ist nicht zu erwarten, daß die gebundenen 300-mere plektonemische Superhelices ausbilden können, sie binden wahrscheinlich vielmehr als annähernd stabförmiges Molekül. Die beim Auswaschen des interkalierten Ethidiums freiwerdende Torsionsenergie muß kompensiert werden, Änderungen des Parameters W , also Formveränderungen wie die Ausbildung einer plektonemischen Überhelix, sind wegen der flachen Fixierung nicht möglich. Es sei aber betont, daß dies nicht die topologische Fixierung betrifft, sondern die konkrete örtliche Fixierung der Enden, die wahrscheinlich die Ausprägung bestimmter Überstrukturen erschwert. Z-22-Bindungsversuche mit sehr kurzen Minizirkeln zeigen ebenfalls, daß kurze Sequenzen eine höhere Neigung zur Ausbildung von Z-DNA bzw. zur Bindung dieser Antikörper haben (Gruskin 1993).

Die Kompensation der im Molekül enthaltenen Torsionsenergie könnte in kurzen, räumlich eingeschränkten Sequenzen wie den hier betrachteten 290 bp-Sequenzen lokale Strangtrennungsprozesse oder die Ausbildung von Z-DNA stärker begünstigen als in vergleichbaren längeren Sequenzen, wenn das Ausweichen in superhelikale Formen erschwert ist. Dies gilt um so mehr, als relative superhelikale Dichten in Sequenzlängen unter 2 kb eine wesentlich höhere Energie haben (siehe weiter unten). In Abwesenheit von anderen Ausweichmöglichkeiten bilden, folgt man dieser Interpretation, kurze Sequenzen bei hohen superhelikalen Dichten von der klassischen B-Form abweichende Strukturen, unabhängig von der Basenzusammensetzung, die dann in unterschiedlicher Weise entweder zu Z-DNA-Bildung, lokaler Strangtrennung oder anderen, nicht charakterisierten DNA-Formen führen. Wenn Z22 nur diese Übergangsstellen erkennt, wäre erklärlich, warum bei höheren superhelikalen Dichten nicht mehr Antikörper bindet, während die mutmaßliche absolute Größe des Bereiches alternativer Struktur ansteigt.

Auch wenn man die hier vorgeschlagene Erklärung akzeptiert, bleibt aber zu erklären, warum der Unterschied in der Z22-Bindung auch bei längeren Konstrukten unabhängig von der

Sequenz zu sein scheint. Da offensichtlich die Bindung topologieabhängig ist, und dennoch die Sequenz keine Bedeutung für die Bindung zu haben scheint, kann nur vermutet werden, daß auch bei längeren Sequenzen die postulierten Besonderheiten der Matrixfixierung ein anderes Verhalten im Vergleich zum freien Plasmid bewirken. Der zu beobachtende etwas weichere Anstieg der Bindungskurve bei längeren Konstrukten spiegelt wahrscheinlich die "Pufferung" von Windungsenergie in längeren Molekülen wider (s. Abb. 38). Nur ein Teil der Population liegt dabei in der Normalverteilung auf der "Z-fähigen" Seite; im Vergleich zu einer ungebundenen Molekülpopulation ist allerdings die Bindung immer noch sehr deutlich erleichtert und wesentlich sequenzunabhängig. Man erkennt in Abb. 38 deutlich den Unterschied zwischen dem pointierten Kurvenverlauf für das kurze und dem etwas weicheren Verlauf für das zehn Mal längere Konstrukt, sowie die unterschiedlichen Kurvenformen für die beiden Antikörper.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Z22 in DNA-Hantelkonstrukten sehr verschiedener Länge in Abhängigkeit von ihrer Topologie an die DNA bindet. Sequenzpräferenzen konnten nicht ermittelt werden. Ohne Vorspannung der DNA ist keine Bindung zu erkennen. Unabhängig davon zeigt Z22 Bindung an eine Vielzahl von Oligonukleotidkonstrukten, wobei jedoch im Rahmen der vorgenommenen Experimente keine klare Sequenz- oder Strukturspezifität erkennbar ist. PaZz und dsRAD1 binden ebenfalls an alle untersuchten Konstrukte, allerdings abhängig von deren Sequenz in unterschiedlicher Stärke.

Induktion von Z-DNA durch anti-Z-Antikörper

Grundsätzlich ist für das beschriebene System die Frage zu bedenken, ob die beobachtete Bindung des Z-Antikörpers Z22 durch diesen selber induziert wurde.

Z-DNA ist prinzipiell durch die Bindung von Z-DNA-spezifischen Antikörpern stabilisierbar (Lafer 1985). Die in der zitierten Arbeit notwendigen Konzentrationen lagen größenordnungsmäßig im selben Bereich wie beim hier vorgestellten System, der Antikörper war allerdings ein anderer. Die Stabilisierung scheint sequenzabhängig zu sein und ist dadurch erklärbar, daß der verwendete Antikörper den im thermodynamischen Gleichgewicht in Z-Form vorliegenden Teil der DNA stabilisiert, damit die Rückreaktion von Z nach B verlangsamt und das Gleichgewicht zwischen Z und B verschiebt. Dementsprechend ist der stabilisierende Effekt stärker bei linearen als bei kovalent geschlossenen, topologisch fixierten Molekülen, weil in letzteren die Fixierung in Z, d.h. das Vorliegen eines Teils des Moleküls in fixiert unterwundenem Zustand mit negativem Wert für W , die Freiheitsgrade der Konformation für das Restmolekül beschränken; dieser Zustand ist offenbar

thermodynamisch unvorteilhaft. Bei offenen, unfixierten DNA-Molekülen stellt sich dieses Problem nicht, da hier die Z-Form eines Teils des Moleküls keine Auswirkung auf die Konformation des Restmoleküls hat.

Wittig (1990) konnten zeigen, daß auch der Z-DNA-spezifische Antikörper Z22 in hohen Konzentrationen Z-DNA induzieren kann. In dem hier beschriebenen System ist eine solche Induktion bei der verwendeten Konzentration von Z22 nicht wahrscheinlich. Zum einen läßt sich dies theoretisch aus den genannten Messungen vorhersagen, da bei den hier gezeigten Experimenten mit einer Endkonzentration von 0,7 ng/µl gearbeitet wurde, was weit unterhalb der Konzentration liegt, bei der Wittig et al. Induktion von Z-DNA fanden. Die Konzentration von Z22, die dort zur Induktion von Z-DNA führte, lag bei etwa 100 ng/µl. Außerdem verwendeten die Autoren der genannten Publikation Mg^{2+} , das die Verlagerung des Gleichgewichts von B-DNA nach Z-DNA erleichtert.

Zum anderen zeigen die hier vorgestellten Experimente deutlich, daß Voraussetzung des torsionsabhängigen Z22-Signals eine topologisch fixierte, kovalent geschlossene DNA ist. In einer solchen DNA-Konformation erzeugt eine Induktion von Z-DNA in einem Teil des Moleküls durch die damit verbundene Änderung des Wertes für T in diesem Teil (Z-DNA hat eine zu B-DNA gegensinnige Helix, und damit einen gegensinnigen Wert für T) eine Änderung des Werts für den topologischen Parameter W im anderen Teil des Moleküls, da sich L nicht ändern kann. Induzierte die verwendete Konzentration von Z22-Antikörper Z-DNA in ungespannter DNA (vor der Bindung: $W=L=0$), so würde durch die Reduktion von T positive Superhelikalität im Rest des Moleküls erzeugt. Da nun die Entstehung von positiver Superhelikalität ein Vorgang ist, der Energie kostet ($\Delta G > 0$), sollte die Induktion von Z-DNA in topologisch fixierter, kovalent geschlossener DNA energetisch ungünstiger sein, als in DNA, die frei rotieren kann, und in der L nicht fixiert ist. Genau das Gegenteil aber wird hier beobachtet.

Energiegehalt von Z-DNA / Thermodynamik von Superhelikalität

Supercoiling in freier, nicht proteinkomplexierter DNA impliziert, wie oben gesagt, eine Erhöhung des Gehaltes der Helix an Konformationsenergie. Nach den gezeigten Ergebnissen drängt sich die Frage auf, zu welchem Ausmaß von Torsionsspannung die verwendeten Ethidiumkonzentrationen geführt haben sollten, und ob diese Torsionsspannung energetisch zu der Ausbildung von alternativen DNA-Strukturen geführt haben könnte.

Es soll kurz ein Ansatz geschildert werden, aus der Konzentration des Ethidiumbromids in der DNA-Lösung vor der Bindung an die Oberfläche auf die superhelikale Energie der

gebundenen DNA nach Auswaschen des Ethidiumbromids zu schließen. Dazu wurden veröffentlichte Daten herangezogen.

Die sog. Freie Energie des Supercoiling ΔG_{sc} wurde experimentell als proportional abhängig

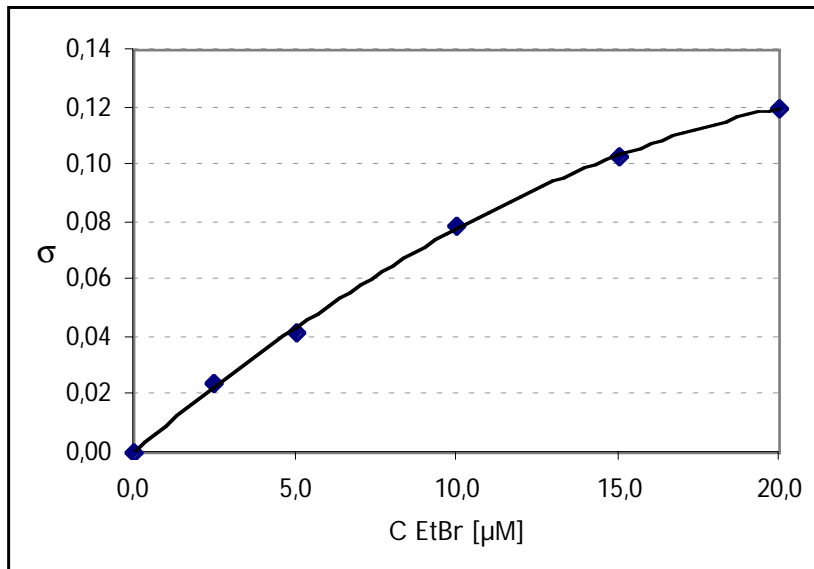


Abb. 54: Abhängigkeit der induzierten relativen Superhelikalität von der Ethidiumkonzentration während der Reaktion (nach Singleton 1982).

dem Quadrat der „Linking Number Difference“ ΔLk , auch als „Linking Deficit“ bezeichnet, (Horowitz 1984) gefunden:

$$\Delta G_{sc} = K \Delta Lk^2$$

Will man diese Größe auf eine Einheit der Kette, beispielsweise ein Basenpaar normalisieren, erhält man durch Division durch die Anzahl an Basenpaaren N

$$\Delta G_{sc} / N = NK (\Delta Lk / N)^2$$

Aus diesem Ausdruck geht hervor, daß die freie Energie des Supercoiling dem Quadrat der superhelikalen Dichte proportional ist. Der Betrag von NK ist abhängig von der Moleküllänge und annähernd konstant für Moleküle größer als zwei Kilobasen. Er wird mit 1150 RT für Moleküle > 2 kb angegeben, doch schwanken die Angaben in der Literatur dazu z.T. beträchtlich (Benham 1992). Für kürzere Moleküle (< 2 kb) steigt der Betrag von NK stark an und erreicht für Moleküle von 200 bp Länge den Wert von 3900 RT (Horowitz 1984). Dies ist

intuitiv nachvollziehbar: Das Energieprofil einer (chemischen) Bindung hat in der Regel exponentiellen Verlauf; die zur Dehnung oder Stauchung erforderliche Energie steigt mit der Entfernung von der Ruhelage exponentiell an. Bei Einführung von Superhelikalität in sehr langen Molekülen entfällt pro superhelikaler Windung nur ein sehr geringer Anteil des Gesamtwinkels auf jede einzelne Bindung. Sobald die Torsionsspannung aber über weniger als eine kritische Mindestzahl an Bindungen verteilt ist, geht die exponentielle Steigerung

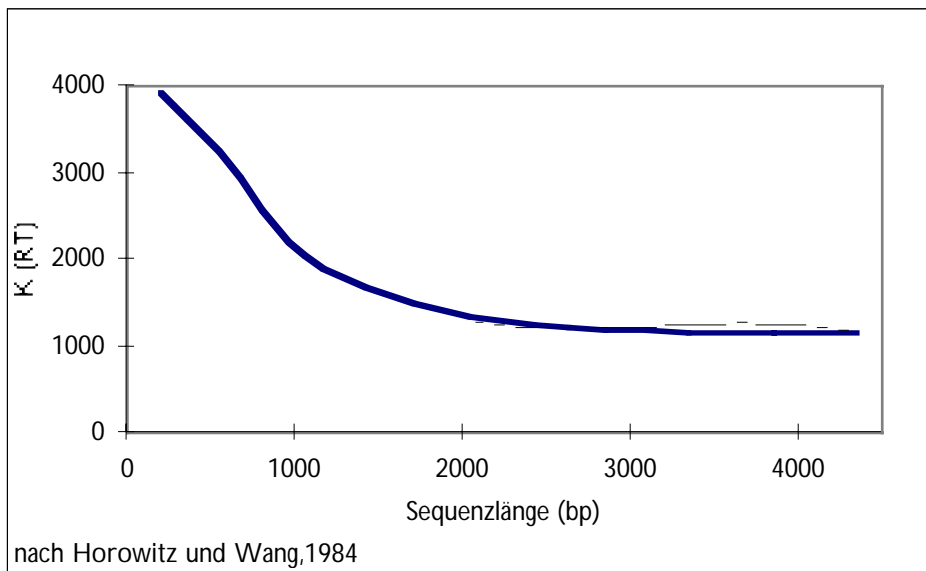


Abb. 55: Abhängigkeit des konstanten Energieterms der Torsionsspannung in DNA von der Sequenzlänge

der Summe der einzelnen am Torsionsvorgang teilnehmenden Bindungen in den Energieterm ein und es ist mehr Energie zur Verwindung erforderlich. Abb. 55 zeigt die Sequenzlängenabhängigkeit des Energieterms graphisch.

Gleichzeitig wird aus dieser Beziehung eine andere Konsequenz der oben diskutierten Energieverhältnisse deutlich: Da sehr kurze Domänen eine viel höhere Energie pro Einheit des ΔL haben, kann durch die Begrenzung von Domänen, z.B. durch Festmachen eines kurzen DNA-Abschnittes am Kernskelett durch Enhancer oder andere bindende Proteine, und nachfolgende Dekondensation von Histonproteinen, theoretisch eine sehr hohe lokale Torsionsenergie induziert werden. Die gleichen Sequenzen könnten also in Abhängigkeit von der Lage der Fixierungspunkte verschiedene Intensitäten von Torsionsenergie enthalten, und somit auch verschiedene Möglichkeiten zur Ausbildung von Alternativstrukturen.

Die Bindung eines Ethidiumbromidmoleküls entwindet die Helix um 26° (Wang 1974). Mit steigender Konzentration des Ethidiumbromids erhöht sich auch die Zahl der bindenden Moleküle, und damit die Unterwindung der interkalierten Helix nach Auswaschen des

Ethidiumbromids. Die Abhängigkeit der induzierten spezifischen superhelikalen Dichte von der Ethidiumkonzentration wurde der Publikation von Singleton und Wells (Singleton 1982) entnommen. Für die danach ermittelten Linking Defizite ΔL können in Abhängigkeit von der Sequenzlänge die resultierenden Windungsenergien berechnet werden:

c(0) [μM]	σ	ΔG (in kJ/mol) für				
		280-mer	600-mer	900-mer	1500-mer	3000-mer
20	0,120	343	578	697	807	1116
15	0,103	252	426	514	594	823
10	0,079	148	250	302	350	484
5	0,042	42,0	70,8	85,4	98,8	137
2,5	0,024	13,7	23,1	27,9	32,3	44,7
0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nach Horowitz & Wang, J.Mol.Biol. 173, 75-91 (1984)						

Diese Konformationsenergie kann die Ausbildung von alternativen DNA-Strukturen erleichtern. In Abhängigkeit von der Sequenz des betroffenen Abschnitts können dabei mehrere Strukturen oder Unterabschnitte miteinander um diese Energie kompetieren (Kelleher 1986). In Abhängigkeit vom Maß der Konformationsenergie führt nicht unbedingt der Abschnitt mit der niedrigsten Übergangsenergiebarriere den Übergang durch (Sen 1987). Zudem kann die Bindung von Liganden an eine Erkennungssequenz relativ hoher Übergangswahrscheinlichkeit den Übergang in alternative Strukturen hindern und die Übergangswahrscheinlichkeit anderer Sequenzabschnitte erhöhen (Sheridan 1999). Die Energie des B-Z-Übergangs für $(\text{CG})_n$ -Sequenzen enthaltende Plasmide unter superhelikaler Spannung in 100 mM NaCl wurde mit $+21 \text{ kJ mol}^{-1}$ für den Übergang ("junction", also pro Seite) der B zur Z-Struktur sowie $+2,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Strukturänderung pro Basenpaar ermittelt (Peck 1983). Bei Ermittlung der Übergangs- ("Junction"-) Energie in CG-haltigen ODN in hohen Salzkonzentrationen ergab sich ein sehr ähnlicher Wert (Doktycz 1990). Unterbrechungen der strikten Folge von YpR-Sequenzmustern "kosten" 10 kJ mol^{-1} (G->C) bzw. 14 kJ mol^{-1} (G->T) (Ellison 1985). Die Initiation der Denaturierung der Stränge hat demgegenüber ein ΔG von 42 kJ mol^{-1} (Bauer 1993).

Die thermische Energie von linearer DNA führt zu einer Normalverteilung von Molekülen unterschiedlicher Konformationsenergie, welche bei höheren Temperaturen zu immer größerer Unterwindung tendiert. Dies kann experimentell dadurch gezeigt werden, daß bei Ligation von DNA-Fragmenten bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Topoisomerenverteilungen entstehen. Der Schwerpunkt der Verteilung tendiert bei

höheren Temperaturen zu einem höheren Linking-Defizit. Aus diesem Experiment wurde der Temperaturbeitrag der thermischen Topoisomeren-Fluktuation zu $0,012 \text{ }^\circ\text{K}^{-1}\text{bp}^{-1}$ ermittelt.

Die obenstehende Tabelle zeigt, daß in den 3 kb-Konstrukten auch bei geringen Ethidiumkonzentrationen genug Torsionsenergie induziert worden sein sollte, um die Entstehung von Z-DNA zu ermöglichen. Für die 280 bp-Konstrukte allerdings gilt dies nicht. Dennoch ist bei allen Konstrukten schon für geringe Ethidiumkonzentrationen ein deutlicher Anstieg des Signals zu beobachten. Es bleibt als Erklärungsansatz wiederum die Unterschiedlichkeit zwischen der hier untersuchten DNA und der zirkulären Plasmid-DNA, an der die Experimente vorgenommen wurden, die letztlich zu den thermodynamischen Daten der B-Z-Übergangsenergie geführt haben.

Neben der oben diskutierten Problematik, welches Epitop der Antikörper Z22 erkennt, ist die Frage zu stellen, ob die torsionsgespannten Konstrukte tatsächlich Z-DNA bilden. Für die poly-(CG)-Sequenzen wäre die Ausbildung von Cruciform DNA (Kleeblattstrukturen, ermöglicht durch Sequenzabschnitte diadischer Symmetrie ("inverted repeats")) eine mögliche Alternative. Es wurden alle verwendeten Sequenzen auf das Vorhandensein solcher Motive mit dem Programm MacMolly Interpret (Schöneberg 1993) untersucht. Die längeren der untersuchten Sequenzen (alle Derivate des Plasmids Blueskript SK) enthielten tatsächlich mehrere nahe beieinander liegende (<15 bp) Repeats, die 15 bp oder größer waren und höchstens 2 Fehlpaarungen enthielten. Die kürzeren Konstrukte enthielten auch eine solche Kandidatensequenz (12 bp, 2 mismatch, distance <15 bp). Allerdings spricht die Thermodynamik der Ausbildung solcher Strukturen dagegen, daß sie nennenswert mit der Bildung von Z-DNA konkurrieren könnten: die 15 bp vermindern das ΔL des betroffenen Konstrukts um 1,5; dazu müssen zwei mal zehn Basenpaare im Loop der Struktur ungepaart bleiben. Die Nukleationsenergie für Cruciform-Strukturen beträgt $>80 \text{ kJ/Mol}$ (nach Frank-Kamenetski 1990), die Bildung solcher Strukturen ist ein sehr langsamer Vorgang.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Matrixfixierung von torsionsgespannter DNA offensichtlich die Ausbildung von alternativen DNA-Strukturen, allem Anschein nach vor allem Z-DNA, ermöglicht. Dabei liefern die erhaltenen Ergebnisse allerdings ein anderes Bild als die Untersuchung von Plasmiden. Offenbar wird durch die Matrixfixierung die Ausbildung von Z-DNA schon bei viel geringeren superhelikalen Dichten und weniger sequenzspezifisch ermöglicht, als dies bei ringförmigen Molekülen in freier Lösung der Fall ist.

Möglicherweise hat dieser Befund Konsequenzen für die Sicht der Verhältnisse in-vivo. Auch dort ist die DNA durch zahlreiche Ligandenbindungen nicht frei beweglich, und

wahrscheinlich kommt das hier vorgestellte System der Beschreibung der topologischen Verhältnisse im Zellkern näher als das Modell zirkulär geschlossener, aber frei rotierbarer DNA. Wenn hier gefunden wird, daß DNA schon unter moderaten lokalen superhelikalen Dichten Z-Form ausbilden kann, muß möglicherweise das Vorkommen von Z-DNA oder anderen zur B-Form alternativen DNA-Formen als viel häufigeres Ereignis, und damit auch die Strukturenviefalt der DNA als viel bunteres Bild, einer Neubetrachtung unterzogen werden.

Nachweis für Topoisomeraseaktivität

Offensichtlich sind Enzyme wie Topoisomerasen, deren fundamentale Funktion in einer Änderung der Topologie von DNA besteht, interessante Untersuchungsobjekte für das vorliegende System. Nicht nur sollte durch sie die Topologie der gebundenen DNA geändert werden können, vielmehr kann auch die Topoisomeraseaktivität selber Untersuchungsgegenstand sein.

Es wurden mehrere Topoisomerasen mit dem hier vorgestellten System untersucht. Alle zeigten eine Wirkung auf die Intensität des Z22-Signals.

DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus

Die Topoisomerase aus Kalbsthymus ist der menschlichen gleich und wird wegen der leichteren Erhältlichkeit verwendet. Das Enzym relaxiert gespannte DNA und führt, wenn man Ethidium zum Reaktionspuffer dazugibt und anschließend wäscht, auch Spannung in die DNA ein (siehe Abb. 40). Dies ist insofern interessant, als es erstens belegt, daß die Topoisomerase auch in Anwesenheit von Ethidium arbeitet (keine triviale Aussage, da interkalierende Agenzien die wichtigsten Inhibitoren dieser Substanzklasse darstellen), und zweitens, daß Topoisomerase auch positive Superhelikalität relaxieren kann. Wie oben bereits gesagt, erniedrigt die Interkalation von Ethidium in DNA den Twist durch Erhöhung der Helixganghöhe nach der Beziehung $T = (n / h_0)$. Nimmt man an, daß die ohne Ethidium gebundene DNA ohne globale Windungen vorliegt ($W = 0$), so ergibt sich, daß nach der Interkalation W für dieses Molekül positive Werte angenommen haben muß:

$$L = \text{konst} = W + T = W_{-EtBr} + (n / h_{0(-EtBr)}) = W_{+EtBr} + (n / h_{0(+EtBr)})$$

für $h_{0(+EtBr)} > h_{0(-EtBr)}$ folgt dann: $W_{+EtBr} > W_{-EtBr}$; für $W_{-EtBr} = 0$ folgt $W_{+EtBr} > 0$

Die Aussage, daß Topoisomerase I auch in Anwesenheit von Ethidiumbromid arbeitet, muß allerdings *cum grano salis* verstanden werden; es wurden dazu keine quantitativen (die Menge und Reaktionszeit der Reaktionspartner variierenden) Experimente vorgenommen. Nachstehend wird für das Beispiel Camptothecin gezeigt werden, daß solche Experimente zum qualitativen Nachweis von Hemmung durchaus notwendig sein können.

Das Enzym ist sowohl an 3 kb-Konstrukten wie auch an 290 bp langen DNA-Molekülen aktiv. Allerdings fällt auf, daß die Abnahme des Signals an den kurzen Konstrukten langsamer verläuft als an den langen Konstrukten (siehe Abb. 41). Dies kann durch zwei (wahrscheinlich additive) Mechanismen erklärt werden: zum einen ragen die längeren Konstrukte möglicherweise weiter in den Raum der freien Lösung hinein und sind so für die diffundierenden Enzymmoleküle schneller erreichbar. Eine andere Form des gleichen Arguments ist die schon mehrfach angebrachte Interpretation, daß die kurzen Moleküle mehr oder weniger starr gebunden sind und flach an der Matrix anliegen. Zum anderen weisen die längeren Konstrukte eine viel höhere Zahl der Konsensus-Erkennungsstellen für Topoisomerase I (VWT^N) auf als die kürzeren Moleküle. Das 280 bp-Konstrukt M9 hat 37 solcher Sequenzmotive, SK_{EcoB} 203 davon. Jedes längere DNA-Molekül stellt also, unabhängig von der Frage seiner Zugänglichkeit, sechs Mal mehr mögliche Bindungs- und Reaktionsstellen für das Enzym zur Verfügung. Welcher der beiden Mechanismen das höhere Gewicht für die Erklärung des Unterschieds in der Relaxationskinetik hat, ist davon abhängig, welchen Vorgang man als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion ansieht: die Diffusion des Enzyms aus der freien Lösung zu seinem Substrat in der Grenzschicht Matrix-Lösung, oder die Diffusion des bereits an die DNA gebundenen Enzyms zu einer Erkennungssequenz. Es erscheint physikalisch wie biologisch nahezuliegen, daß der erstere Vorgang der langsamere und damit kontrollierende Schritt ist.

Prototyp des Inhibitors für Topoisomerase I aus Eukaryonten ist das Camptothecin (siehe Abb. 10). Es wurden mehrere Konzentrationen des Wirkstoffes zum Topoisomerase I-Puffer gegeben und die Veränderung des Z22-Signals über die Zeit gemessen (siehe Abb. 42). Es gibt offenbar in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer und der Konzentration des Enzyms einige Datenpunkte, an denen eine Hemmung klar erkennbar wird, aber ebenso sind Zeiten erkennbar, für die sich die Meßwerte mit und ohne Inhibitor sich nicht voneinander unterscheiden.

Die Erklärung für dieses Phänomen ist im Mechanismus der Hemmung der Topoisomerase I durch das Camptothecin zu suchen. Wie oben bereits zitiert, hemmt Camptothecin die Reaktion durch Verlangsamung des Religationsschrittes. Dies bedeutet aber, daß auch eine durch Camptothecin gehemmte Topoisomerase den ersten Schritt des Reaktionszyklus, die Öffnung eines der beiden DNA-Stränge, durchlaufen kann. Damit kann aber auch alle

Torsionsspannung aus dem Molekül entweichen, und der individuelle Beitrag zum gemessenen Signal ist verloren, als wäre die Topoisomerase nicht gehemmt worden. Der Unterschied liegt danach in der mangelnden Möglichkeit für die Enzymmoleküle, nach Abschluß der Reaktion vom Substrat abzdifundieren. Dabei muß beachtet werden, daß den Unterschied hier einzig Enzymmoleküle ausmachen, die bereits auf einem Substrat gebunden hatten, denn nur diese können inhibiert werden; „frisch“ aus der Lösung kommende Moleküle hingegen werden im ersten Schritt relaxieren.

Dementsprechend ist der größte Unterschied zwischen gehemmtten und ungehemmtten Ansätzen nicht zu Beginn der Reaktion zu beobachten, sondern erst dann, wenn die geschilderte Diffusionskomponente an Bedeutung gewinnt. Wann dies der Fall ist, muß für die Kombination Substrat-Enzymkonzentration-Reaktionstemperatur jeweils bestimmt werden.

Die Literatur macht widersprüchliche Angaben über die Notwendigkeit von Magnesium als Kofaktor für die Aktivität von Topoisomerase I. Es wurden mehrere Pufferzubereitungen auf ihre Auswirkung auf die Enzymaktivität geprüft. Während festzustellen ist, daß Topoisomerase offensichtlich auch in Abwesenheit von Magnesium arbeitet, erhöht die Zugabe des Metalls die Aktivität erheblich (siehe Abb. 43). Noch ausgeprägter ist der Effekt bei der Spannung der Moleküle durch nachträgliche Inkubation mit Topoisomerase in Anwesenheit von Ethidiumbromid. Dies und die in Abb. 43 erkennbare starke Abhängigkeit des Phänomens von der Menge des eingesetzten Enzyms weist darauf hin, daß es sich auch hier wahrscheinlich um ein den Religationsschritt der Reaktion betreffendes Phänomen handelt.

Der Sinn eines Systems zur Messung der Hemmung von Topoisomeraseaktivität wird vor allem darin bestehen, neue Inhibitoren zu finden. Die beiden Qualitäten, die ein solches System aufweisen sollte, sind Sensitivität und Selektivität. Anders formuliert: das System sollte möglichst alle „echten“ Inhibitoren erkennen (Sensitivität: Minimierung der falsch Negativen) und dennoch keine Substanzen als positiv ausweisen, die nicht die gesuchte Aktivität haben (Selektivität: Minimierung der falsch Positiven). Die Abb. 42 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen die Wirkung von CCT bereits bei 0,1 μM Konzentration zu erkennen ist; diese Konzentration liegt zwei Größenordnungen unterhalb der physiologisch eingesetzten (dabei ist zu beachten, daß normalerweise die Konzentration von physiologisch aktiven Substanzen in in-vitro-Versuchen drei- bis zehnmal höher gewählt wird als in-vivo). Allerdings ist der hier betriebene Aufwand für ein automatisiertes Wirksubstanz-Suchsystem kaum zu rechtfertigen. Es werden da kaum fünf Zeitpunkte und vier oder mehr Konzentrationen, möglicherweise dupliziert, für

jede zu untersuchende Substanz aufgenommen werden können. Essentiell für die Durchführung einer Wirkstoffsuche ist also die Validierung des Systems anhand bekannter Inhibitoren.

Ein Beispiel für diesen Vorgang gibt Abb. 44. Darin ist die relative Aktivität der Topoisomerase bei verschiedenen Zeiten gezeigt, d.h. der Wert für $t=0$ geteilt durch den Wert bei t_i . Diese Auftragung erleichtert den Vergleich der Werte, gleichzeitig verfälscht sie aber leicht das Bild, da besonders für lange Inkubationszeiten und die daraus resultierenden geringen absoluten Signale die relativen Fehler der Auftragung sehr groß werden. Der relative Fehler der Meßpunkte längerer Inkubationszeiten kann leicht auf Werte $>20\%$ ansteigen. Man erkennt an Abb. 44 deutlich, daß für die hier gewählten Reaktionsbedingungen die Betrachtung der Werte bei 15 min die differenzierteste Aussage über die Hemmung der Topoisomerase zuläßt. Als Kontrolle war der klassische Hemmstoff der bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase), Ciprofloxacin, benutzt worden. Es überrascht, daß nach den hier gefundenen Ergebnissen Ciprofloxacin bei hohen Konzentrationen offenbar eine gewisse Hemmende Wirkung auf Topoisomerase IB hat. Dies stimmt allerdings mit neueren Literaturdaten durchaus überein (Wang 1996). (Wenn die These zutrifft, daß Topoisomerasehemmer eine Erhöhung der Rekombinationsrate bewirken, sollte die Verwendung von kollateral Topoisomerase I-hemmenden Pharmaka außer für unmittelbar lebensbedrohende Situationen allerdings kritisch hinterfragt werden.)

Zur Ermittlung der Selektivität des Assays müßte eigentlich eine größere Anzahl von Testsubstanzen untersucht werden, möglichst solchen, die mit alternativen Testmethoden auf ihre Qualitäten als Topoisomerasehemmer geprüft wurden. Stärke und Schwäche des hier vorgestellten Systems ist es, daß solche Systeme nicht zur Verfügung stehen. Es wurden alle im Ursprungslabor dieser Arbeit gefundenen Substanzen in $20 \mu\text{M}$ Konzentration geprüft. Eine dieser Untersuchungen ist in Abb. 45 gezeigt. Bei dieser Auftragung wäre die Wirkung von Ciprofloxacin auf das Enzym nicht aufgefallen; dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die gewählten Reaktionsbedingungen noch optimiert werden können. In einigen solcher Untersuchungen traten auch die Tyrphostine als Inhibitoren auf.

Pro- und Eukaryontische DNA Topoisomerase-II

Als Modellsystem für eukaryote Polymerase II wurde das aus *Drosophila* isolierte Enzym (Promega), für prokaryote Topoisomerase II das Enzym aus *Micrococcus luteus* (GibcoLife), verwendet. Die Ergebnisse für das eukaryotische Enzym (s. Abb. 46) entsprechen in etwa denen für das Typ-I-Enzym, so kann es positive wie negative Superhelikalität relaxieren. Entsprechend der großen phylogenetischen Ähnlichkeit der Vertreter der Klasse II sind die beiden bekannten Inhibitoren der Aktivität in prokaryoten Zellen auch am eukaryonten

Enzym wirksam. Wegen des hohen Preises der eukaryonten Topoisomerase II wurden keine weiteren Untersuchungen damit durchgeführt.

Abb. 47 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der prokaryoten Topoisomerase II (Gyrase) nach dem bereits oben angewendeten Schema. Das Enzym relaxiert offenbar unterwundene DNA, doch war es in diesem Experiment nicht in der Lage, Überwindungen positiven Vorzeichens zu entfernen (siehe Abb. 47 A Nr. 3); dies stimmt nicht mit der Literatur überein (Hsieh in Cozzarelli 1990), wonach in Anwesenheit von ATP diese Aktivität durchaus vorhanden sein sollte. Möglicherweise störte die Anwesenheit des Ethidiums die Aktivität; der Versuch müßte in Anwesenheit von Chlorochin wiederholt werden, um dies festzustellen.

Bis auf Novobiocin zeigt keiner der untersuchten Inhibitoren eine erkennbare Hemmung der Relaxationsreaktion. Offensichtlich liegt hier ein der für die Topoisomerase I-Hemmer geschilderten Problematik ähnlicher Fall vor. Die Parameter Zeit, Enzymkonzentration und Temperatur werden für das Enzym optimiert werden müssen, um zu befriedigenden Ergebnissen hinsichtlich Sensitivität und Selektivität zu kommen.

Prokaryote DNA Gyrase soll DNA in Anwesenheit von ATP unterwinden können. Dies konnte mit dem vorliegenden System nicht bestätigt werden; zumindest wurde kein Z22-signal gefunden. Dies allerdings ist nicht sehr erstaunlich: Zur Unterwindung benötigt das Enzym eine Knotenstelle, an der sich zwei Bereiche des selben Doppelstranges überlappen. Nach dem oben gesagten ist zu erwarten, daß ein kennzeichnendes Merkmal des hier vorgestellten Systems ist, daß sich kurze DNA-Stücke (<10 kb) auf der Matrix nicht häufig überkreuzen und daher für die Enzymaktivität nicht zugänglich sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für alle untersuchten Enzyme, von denen erwartet werden konnte, daß sie eine Veränderung der statischen Topologie der gebundenen DNA herbeiführen sollten, diese Aktivität nachweisbar war. Für alle untersuchten Hemmstoffe solcher Enzyme wurde ein Einfluß auf die Enzymaktivität demonstriert. Die Standardisierung und Validierung des Systems für die Suche nach neuen Wirkstoffen wird, nicht überraschend, noch einige Investitionen in Zeit und Material erfordern. Die grundsätzliche Eignung des Systems, quantitative Aussagen zur Hemmung von Topoisomeraseaktivität in einem automatisierbaren System zu machen, ist demonstriert worden.

An dieser Stelle sei der Ausblick gestattet, daß das vorgestellte System auch zur Untersuchung nichtenzymatischer Aktivitäten, vor allem Toxizitätsprüfung, verwendbar wäre. Für in Industrie und Umwelt vorkommende chemische Verbindungen wird immer häufiger der

Nachweis eines Tests möglicher DNA-Schädigung durch die Substanz gefordert. Das Modell matrixfixierter, torsionsgespannter DNA wäre sicher zu einem Nachweis solcher Aktivität besonders sensibel; immerhin reicht ein einziger Strangbruch des Polymers, um den Beitrag des betroffenen Moleküls zum Gesamtsignal zu unterdrücken.

RNA-Polymerase-Aktivität

Ursprünglich sollte untersucht werden, ob die nach dem Twin-Domain-Modell beim Transkriptionsvorgang erzeugte superhelikale Energie ausreichte, um Biotin-gebundene DNA aus ihrer Verankerung zu lösen. Es gibt einen Hinweis in der Literatur, daß durch die promotorabhängige Aktivität von Bakteriophage T7 RNA-Polymerase die Bindung von biotinylierten Templaten an eine Streptavidinmatrix gelöst wird (Fujita 1993). Dieser Befund ließ sich allerdings nicht bestätigen. Weder an topologisch fixierten, gespannten DNA-Templatmolekülen, noch an offenen, linearen Molekülen, von denen T7-RNA Polymerase von einem T7-Promoter im run-off-Modus transkribieren kann, ohne daß sie gegen eine ansteigende "Wand" positiver Superhelikalität anlaufen müßte, wurde ein nennenswerter Verlust an anti-DNA-(2C10)-Signal beobachtet; auch dann nicht, wenn ein Rückbinden der DNA durch freies Biotin verhindert wurde (Daten nicht gezeigt).

Bei der Kontrolle dieser Ergebnisse mit dem Antikörper Z22 wurde allerdings ein in Abhängigkeit von T7-RNA-Polymeraseaktivität auf ungespannte Kontrollwerte zurückgehendes topologieabhängiges Signal gefunden (siehe Abb. 49). Kontrollen zeigen, daß dieses Phänomen nicht für die Polymerase aus T7 spezifisch ist, sondern auch von der RNA-Polymerase aus T3 und SP6 gezeigt wird. Zugabe des Enzyms ohne Nucleosidtriphosphate (NTPs), oder Weglassen nur eines der vier NTPs, verhindert auch das Auftreten des Effekts. Das Phänomen ist dennoch insensitive gegen RNase A sowohl bei Zugabe während der Reaktion als auch danach.

Die Behandlung der gebundenen Nucleinsäure mit RNase H, einem Enzym, was selektiv nur als DNA:RNA-Hybrid gebundene RNA hydrolysiert, regeneriert das topologieabhängige Signal. Dabei ist es nicht wesentlich, ob das Enzym während oder erst nach der Polymeraseaktivität zugegeben wird. (In Abb. 49 ist jeweils nur eine der beiden Alternativen für beide verwendeten RNasen gezeigt, die Werte waren bei gleichzeitiger wie bei nachträglicher Inkubation mit der RNase praktisch gleich.) Gespannte DNA-Konstrukte ohne Promotor-Konsensussequenz zeigen keinen Rückgang des Z22-Signals bei Inkubation mit NTPs und Enzym.

Die in Abb. 49 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, daß die Aktivität von RNA-Polymerase reversibel die Topologie des Templats ändern kann, und daß diese Reversibilität durch die Behandlung mit RNase H erreicht wird. Es scheint also alles darauf hinzuweisen, daß ein durch die Polymerase erzeugtes DNA:RNA-Hybrid, ein sog. "R-Loop" die Topologie ändert. Abb. 56 stellt die Entstehung dieser Struktur schematisch dar.

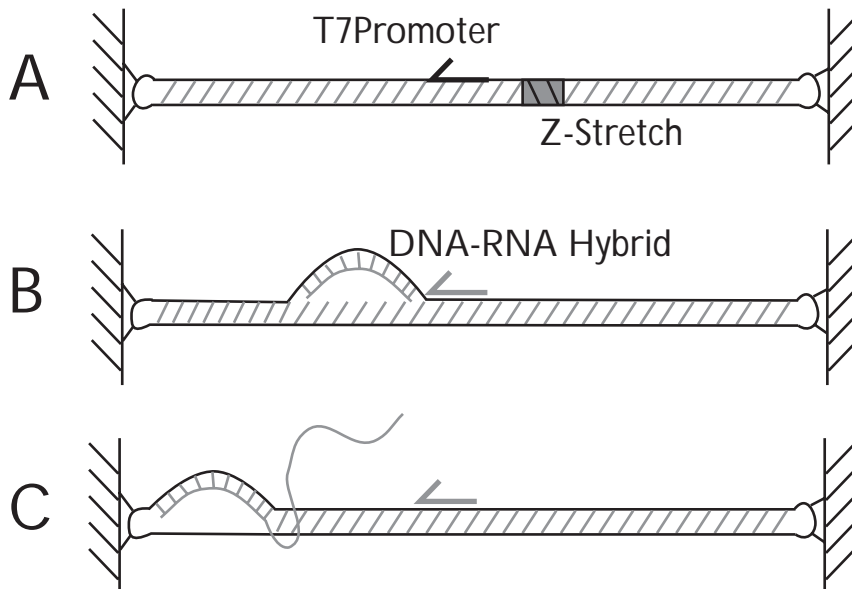


Abb. 56: Schematische Darstellung der Entstehung eines R-Loops. Details siehe Text.

Drolett et al. (1994) konnten zeigen, daß die bei Transkription mit E.coli RNA-Polymerase entstehende hypernegative Superhelikalität in Plasmiden auf das Entstehen von R-Loops zurückzuführen ist, also in die DNA gebundene RNA aus dem Transkript, die bei der Präparation der DNA vor Analyse entfernt wird und so die starke Torsionsspannung freigibt. Offensichtlich bilden sich diese R-Loops bei der Transkription und vermindern so das starke, hinter der Polymerase entstehende Supercoiling (Drolett 1994). Die Autoren geben an, daß unter den gleichen Bedingungen keine R-Loops durch Hybridisieren von externer RNA möglich war. Dies entspricht den hier gemachten Beobachtungen, nach denen die run-off Transkription von einem nur strangaufwärts der Promotorsequenz befestigten oder in Lösung befindlichen Matrizenmolekül nicht das Z22-Signal einer promotorlosen, gespannten Sequenz unterdrücken konnte (nicht gezeigt).

Geht man von einem gespannten Konstrukt aus, so kann davon ausgegangen werden, daß ein kleiner Teil der Sequenz in einer alternativen Struktur, z.B. Z-DNA, vorliegt. Bei einem 3 kb-Konstrukt, welches mit 20 μM Ethidium gespannt wurde, beträgt das Linking Defizit $\Delta Lk = 34$. Um dieses vollkommen zu kompensieren, müßten 17 volle Helixumdrehungen Z-DNA entstehen. Alternativ könnte es dadurch ausgeglichen werden, daß 34 Helixumdrehungen (357 bp) der Helix denaturieren. Der erstere Weg der Z-DNA-Ausbildung ist mindestens teilweise abhängig von der Sequenz, nicht "Z-fähige" Sequenzen kosten sehr viel Übergangsenergie. Die Denaturierung eines so langen Segments ist natürlich energetisch noch sehr viel kostspieliger. Die Aktivität der Polymerase löst dieses Problem auf ideale Weise: durch die Initiation wird die DNA teilweise denaturiert (die Unterwindung "hilft" dabei energetisch), mit jedem synthetisierten Helixbaustein entsteht ein RNA:DNA-Hybrid (energetisch favorisiert gegenüber der Situation für DNA-DNA), was die Denaturierung eines DNA:DNA-Hybrides energetisch kompensiert, sowie ein ungepaarter DNA-Baustein, der ein ΔL von 0,1 kompensiert. Bis das gesamte ΔL kompensiert ist, gibt es offensichtlich keinen energetischen Grund für die Ablösung des

c(0) [μM]	σ	ΔL
20	0,12	-34
15	0,103	-29
10	0,079	-23
5	0,042	-12
2,5	0,024	-7
0	0	0

Abb. 57: Linking Defizite für ein 3000 bp-Konstrukt in Abhängigkeit von der Konzentration des Ethidumbrommids bei der Bindung

hinter der Polymerase wachsenden Hybrides.

Interessant wird die Situation, wenn das Linking Defizit durch die Aktivität der Topoisomerase vollkommen kompensiert ist. Ob dies tatsächlich nach Durchlaufen von ΔL Helixdurchgängen der Fall ist, oder bereits früher, weil andere Prozesse einen Teil der Torsionsenergie kompensieren, mag dahingestellt sein. Jetzt hat die Polymerase mehrere "Handlungsalternativen": sie hält entweder an, oder sie ist weiter aktiv, und für jedes weitere synthetisierte N am 3'-Ende der Kette löst sich am 5'-Ende ein Hybrid auf, und der DNA-Doppelstrang wird hinter dem R-Loop zugezogen. Die beiden Alternativen sind als B und C in Abb. 56 dargestellt.

Um die Frage klären zu können, welcher der beiden Alternativen für die hier betrachteten Konstrukte von den benutzten Polymerasen gewählt wird, wurde zunächst an 3-kb-Konstrukten überprüft, ob die beobachtete Unterdrückung des Signals von Z22 auch bei

hohen Unterwindungen und sehr kurzen "Wegen" der Polymerase bis zum Ankerpunkt auftritt. Abb. 48 zeigt schematisch die Lage der Promotoren von T7 (links) und T3 (rechts) auf den Konstrukten.

Abb. 50 zeigt die Unterdrückung des Signals durch Polymeraseaktivität in Anwesenheit der NTPs bei verschiedenen Vorspannungen (entsprechend Ethidium-Konzentrationen). Es zeigt sich, daß eine genügend hohe Konzentration an Polymerase bei jeder Torsionsspannung das Z22-Signal vollkommen unterdrückt. Der Trend ist robust bis über 50 μM Ethidium (nicht gezeigt). In keinem der Konstrukte kann die T7-Polymerase länger als 70 bp bis zur Schleife laufen; dies entspricht einer Kompensation von sechseinhalb Unterwindungen. Es muß die Polymerase also entweder durch den Loop lesen können oder es müssen andere Mechanismen für kürzere Transkripte das Z22-Signal unterdrücken.

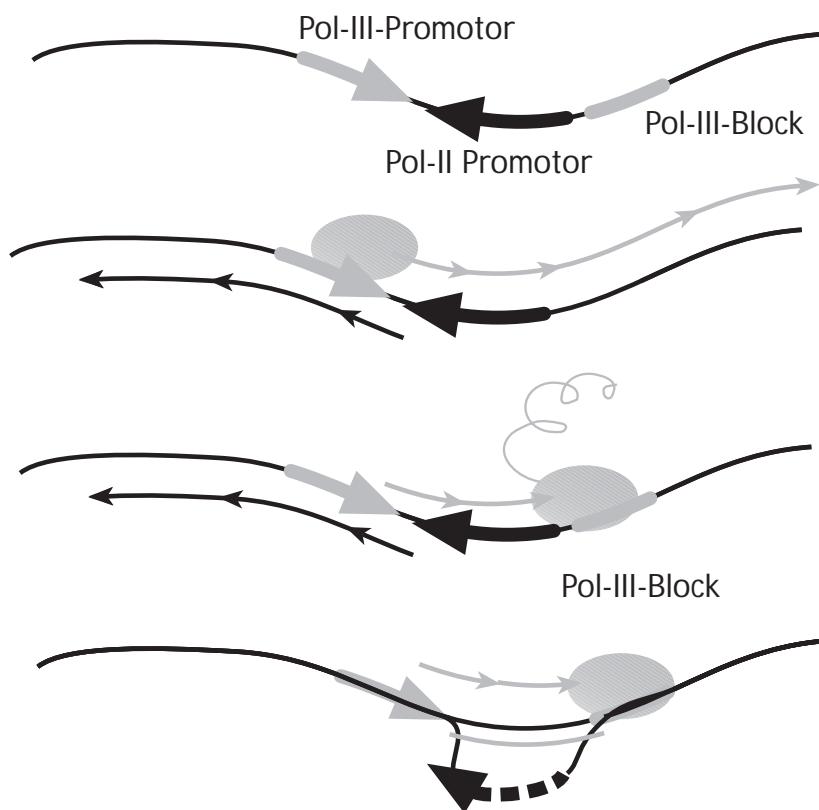


Abb. 58: Möglicher Mechanismus der Transkriptionskontrolle durch RNA:DNA-Hybride: der Promotor für Pol II ist von einem gegenläufigen Pol III-Promotor und einem Pol III-Transkriptionsblock eingeschlossen. Ohne Block beeinflussen die Promotoren einander nicht (2.v.o.). In ungespannter DNA löst sich das Transkript trotz Halt der Polymerase am Block, und der Pol II-Promotor ist operabel (3.v.o.). In torsionsgespannter DNA bildet sich ein R-Loop und der Pol II-Promotor ist inaktiviert.

Die Meßmethode mit Z22 leidet etwas darunter, daß hier offenbar kein differenzierter Grad an Unterwindung an individuellen Molekülen gemessen wird, sondern ein "alles-oder-nichts-Signal" für viele Moleküle. Die transkriptionsabhängige Unterdrückung findet sich allerdings auch für das paZz-Signal (Daten nicht gezeigt), insofern sind die Daten also robust. Die Heterogenität des paZz macht diese durch eine Bindung des polyklonalen Antikörpers allerdings auch nicht aussagekräftiger. Eine mögliche Methode, durch Antikörperbindung mehr über die Menge gebundenen RNA-Hybrids aussagen zu können, wäre die Bindung eines RNA-DNA-Hybridantikörpers (dieser konnte leider von dr. Stollar nicht zur Verfügung gestellt werden). In jedem Fall müssen hier aber zur Aufklärung der Frage, ob die Polymerasen durch den Loop lesen können, RNA-Gele und präferentiell auch elektronenmikroskopische Bilder gemacht werden. Interessant wäre die Klärung der Frage, ob auf gespannter DNA der R-Loop die Reinitiation von einer "zweiten Runde" Transkription inhibiert wird.

Eine interessante Perspektive, die dieses System bietet, ist die mögliche Demonstration der funktionellen Steuerung von Promotoren durch R-Loops in Abhängigkeit von der Topologie der zugehörigen Domäne (siehe Abb. 58).

Ein anderes interessantes Ziel wäre auch die Verankerung der Polymerase auf der Matrix und die Verankerung der DNA nur am strangaufwärts der Promotorsequenz gelegenen Ende. Es liegen in der Literatur Hinweise darauf vor, daß T7 RNAP im zirkulären Plasmid transient genug negative Superhelikalität erzeugt, daß die Bindung von anti-Z-Antikörper induziert werden kann (Dröge und Nordheim 1991). Nach diesen Untersuchungen soll T7 RNAP durch einen in Z-Form vorliegenden Sequenzabschnitt durchlesen können, wird aber durch anti-Z-Antikörper an dieser Position blockiert (Dröge und Pohl 1991). T7 RNA-Polymerase zeigt selber auch eine gewisse Präferenz in der Topologie des Templats: sie kann zwar sowohl an linearen als auch an superhelikalen Templaten initiieren, zeigt aber ein etwa doppelt so hohes K_M bei linearen Templaten, entsprechend einer geringeren Initiationsrate ohne Spannung des Promotors (Ikeda 1992). Dröge und Pohl (1991) zeigen ein Maximum der Initiationsrate von T7 RNAP bei einer superhelikalen Dichte von $\sigma=0,7$.

Fazit und Ausblick

Das von mir entwickelte molekulare Design und die experimentelle Anordnung sollte DNA in matrixgebundener Form und mit kontrollierter Topologie zugänglich machen. Dieses Ziel ist erreicht worden. Das erarbeitete System hat in meinen Augen drei wichtige Aspekte, die von den hier geschilderten Untersuchungen repräsentiert werden:

Es erleichtert die Untersuchung von topologieverändernden Enzymen und Agenzien und hat damit einen sehr praktischen Wert. Die damit zugänglichen Erkenntnisse sind vielfach direkt auf physiologische Fragestellungen übertragbar. Die Untersuchungen zur Hemmung von Topoisomerase sind dafür ein gutes Beispiel. Die matrixfixierte DNA dient als Substrat, der Nachweismechanismus über den Z-DNA-spezifischen Antikörper Z22 oder andere topologiespezifische Liganden ist jederzeit äquivalent ersetzbar.

Daneben liefert das molekulare Design auch einen interessanten Einblick in die Strukturvielfalt torsionsgespannter DNA selbst, und in die Struktur-Bindungsverhältnisse von DNA-Liganden. Daß DNA in Abhängigkeit von ihrer konformatorischen Beschränkung, zumindest hier als Ergebnis der Matrixbindung, bei geringerer Spannung und offenbar weitaus weniger sequenzspezifisch als angenommen, Z-DNA ausbilden kann, ist überraschend und gibt zu weiteren Experimenten Anlass. Wie oben bereits gesagt, ist es durchaus möglich, daß DNA im Zellkern in ihren Freiheitsgraden so eingeschränkt ist, daß sie dem hier untersuchten Modell viel ähnlicher ist als dem bisher hauptsächlich verwendeten zirkulären Äquivalent aus Plasmid-DNA. Insofern kann also die DNA auch selber Untersuchungsgegenstand sein.

Zuletzt ist in dem vorgestellten System auch die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von topologischen Zuständen für DNA-abhängige Prozesse möglich, wie sie von den skizzierten Experimenten zur Polymerase repräsentiert werden. Offensichtlich ist die dauernde, über mehrere zeitlichen Größenordnungen sich erstreckende topologische Dynamik von DNA eines ihrer grundlegenden Merkmale. Es ist kaum vorzustellen, daß topologische Qualitäten nicht auf vielen Ebenen in die von der DNA ausgehenden und bei ihr endenden Signalketten einfließen. Meine größte Neugier betrifft die zu dieser Thematik bisher nicht durchgeführten Experimente.

Bei diesen wäre das Erkenntnisziel die Einbettung des topologischen Zustands der DNA, sei es des statischen oder eines enzyminduzierten dynamischen Zustands, in das System der Transkriptionskontrolle.

Damit wäre aber auch bereits eine wichtige Einschränkung des Systems zu nennen: Transkription in Eukaryonten läuft mit der oder gegen die Präsenz von Nukleosomen auf der DNA ab. Es gelang mit der matrixfixierten DNA nicht, messbar Histone an die DNA zu binden, geschweige denn einen Nachweis intakter rekonstituierter Histon-Oktamere zu erbringen. Dies mag an der zeitlichen Investition in dieses Vorhaben gelegen haben, könnte aber auch damit zusammenhängen, daß die untersuchte DNA recht kurz war, und längere Stücke verwendet werden müßten.

Es wurde nicht untersucht, ob wesentlich längere DNA-Fragmente auch das hier zumeist gemessene Z22-Signal zeigen würden; es ist allerdings anzunehmen, daß die postulierten Eigenheiten der kürzeren Fragmente bei Verlängerung sich irgendwann den bekannten Eigenschaften von zirkulärer (in ihrer Bewegung weniger eingeschränkter) DNA annähern werden.

So nützlich Z22 für die hier gezeigten Untersuchungen war, so wünschenswert wäre eine differenziertere und vor allem schnellere Messung von DNA-Topologie. Eine Einschränkung besteht auch darin, daß die festgestellten Zustände alle statische Superhelikalität reflektieren, obwohl die interessantesten Untersuchungen sicher die dynamische Verteilung topologischer Zustände im Zusammenhang mit Transkriptionsvorgängen betreffen. Ebenfalls wurde DNA nur in unterwundenem Zustand untersucht, was für statische Zustände sicherlich gerechtfertigt ist (trotzdem wäre hier eine Ausdehnung auf Überwindung aus Gründen der Neugier wünschenswert gewesen).

Eine zeitnahe Messung, wenn auch mit Z22, wäre bei Rekonstitution des Systems auf einem für Surface-Plasmonresonanz (SPR) geeigneten Chip möglich. Leider war es nicht möglich, das System auf dem von BiaCore vertriebenen Streptavidin-Chip zu etablieren. Das ODN 796skBio (siehe oben: Bindung von Z22 an ODN) zeigte wunderschöne Bindung an Z22 und 2C10; leider war eine ebensolche Kurve an matrixfixierter DNA nicht möglich. Wahrscheinlicher Grund ist die benötigte hohe Dichte an Streptavidin auf der Oberfläche der Matrix; diese war bei dem SPR-Material nicht zu erwarten. Versuche mit anderen SPR-Matrices könnten hier helfen.

Eine interessante Alternative zu der Verwendung von Z-DNA-spezifischen Liganden wäre die direkte spektroskopische Untersuchung. Die klassische Aufnahme von Zirkular-Dichroismus-Spektren würde bei einer Verteilung von zwei Helixdurchgängen Z-DNA in 300 bis 500 Helices B-DNA kaum sinnvolle Ergebnisse liefern. Allerdings ändert das Entstehen

von Z-DNA die Periodizität der B-DNA-Helix. Diese Tatsache macht sich ein sehr eleganter Ansatz zunutze: Er verwendet auf B-DNA ein Paar von Fluoreszenz-Donor- und Akzeptorfluorophoren, die in B-DNA so nebeneinander liegen, daß die Emissionswellenlänge des Donors durch den Akzeptor absorbiert wird. Beim Übergang in die Z-Konformation wird diese räumliche Nähe aufgehoben und so der Übergang der beiden Konformationen durch eine Änderung in der gemessenen Emission sichtbar gemacht (Fluoreszenz-Resonanz-Transfer, FRET) (Mao 1999). Dieser Ansatz könnte auch im vorliegenden System angewendet werden, entsprechende Experimente sind in Vorbereitung.

Die Untersuchung der DNA-Topologie und ihrer Manifestationen ist nur eine Vorbereitung auf die Frage nach deren möglicher Bedeutung im Zusammenhang mit dem Funktionieren von Zellen und ihren Verbänden. Solche Fragen sind wahrscheinlich der Horizont, vor dem fast alle molekularbiologischen Experimente vorgenommen werden. Mein Modell ermöglicht in diesem Zusammenhang innerhalb dieses eingeschränkten, aber gut definierten Systems Aussagen, die ohne weiteres anders nicht zugänglich sind.