

Matrixgebundene Topologisch Fixierte DNA

Dissertationsschrift

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich für Chemie, Biologie und Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Claas Junghans

aus Berlin

Berlin, im November 1999

...Denn wenn Vater Leverkühn uns fragte, was wir davon hielten, und wir ihm zaghaft antworteten, es möchten Pflanzen sein,-„nein“, erwiderte er, „es sind keine, sie tun nur so. Aber achtet sie deshalb nicht geringer! Eben daß sie so tun und sich aufs beste darum bemühen, ist jeglicher Achtung würdig.“

(Thomas Mann, *Doktor Faustus*)

Tag der Disputation: 7. Januar 2000

Erster Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ralf Erdmann

Zusammenfassung	6
Summary	7
Einleitung.....	8
Analogie.....	9
DNA-Sequenz ist mehr als eine abstrakte Zeichenfolge.....	9
DNA-Liganden-Interaktion ist sequenz- und topologieabhängig	10
Topologie.....	11
Konzept und Nomenklatur.....	12
Die Bedeutung topologischer Grundbegriffe für DNA.....	14
Die biologische Bedeutung von Superhelikalität	17
Struktur und Energie.....	17
Toroidale und plektonemische Superhelices.....	18
Alternative DNA-Strukturen	19
Histone, Nukleosomen, Chromatin.....	21
Lokale Domänen aktivierter Chromatinstruktur	23
Promotoren, Enhancer.....	24
Isolatoren	24
Locus-Kontrollregionen	25
Kerngerüst.....	27
Das Twin-Domain-Modell	27
DNA-Topoisomerasen.....	30
Klasse I Topoisomerasen.....	30
DNA-Topoisomerasen der Klasse II	32
Topoisomeraseinhibitoren.....	32
Experimentelle Belege für die Annahmen des Twin-Domain-Modells	37
Die Z-DNA-affine Domäne des RNA-Edierungsenzyms ds-RAD	38
Aufgabenstellung	40
Eigene Untersuchungen	42
Synthesekonzept für die zu bindenden DNA-Konstrukte.....	42
Ergebnisse.....	44

Synthese der kovalent geschlossenen biotinylierten Hantelkonstrukte.....	44
Nachweis von matrixgebundener DNA durch Antikörper	46
Nachweis topologieabhängiger DNA-Formen mit Z-DNA-spezifischem Antikörper Z22.....	48
Bindung des Antikörpers Z22 an ODN.....	56
Bindung von Z-DNA spezifischem polyklonalen Antikörper.....	59
Abhängigkeit der Antikörperbindung von Sequenz und Konstruktlänge.....	60
Kompetition von Z22 mit paZz.....	62
DNA Topoisomerase-II aus Drosophila.....	66
DNA-Topoisomerase II aus micrococcus luteus (Gyrase)	66
RNA-Polymerase-Aktivität.....	68
Diskussion.....	70
Synthese der kovalent geschlossenen biotinylierten Hantelkonstrukte.....	70
Topologisch fixierende Bindung von DNA an Oberflächen	71
Bindung von DNA-spezifischen Antikörpern an matrixgebundene DNA.....	73
Strategie zur Einführung von Torsionsspannung in die gebundene DNA.....	74
Nachweis topologieabhängiger DNA-Formen mit Z-DNA-spezifischem Antikörper Z22.....	76
Bindung des Antikörpers Z22 an ODN.....	80
Nachweis topologieabhängiger DNA-Formen mit anti-Z-DNA polyklonalem Antikörper.....	81
Abhängigkeit der Antikörperbindung von Sequenz und Konstruktlänge.....	82
Kompetition von Z22 mit paZz.....	84
Induktion von Z-DNA durch anti-Z-Antikörper	87
Energiegehalt von Z-DNA / Thermodynamik von Superhelikalität	88
Nachweis für Topoisomeraseaktivität	93
Pro- und Eukaryontische DNA Topoisomerase-II	96
RNA-Polymerase-Aktivität.....	98
Fazit und Ausblick	103
Material und Methoden.....	106
Herstellung von Hantel-DNA.....	106
Bindung von DNA an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten.....	107
ELISA:	107
Etablierung von ELISA-Methoden:	109
Enzymreaktionen an matrixfixierter DNA	109
Herstellung der Konstrukte.....	109

Anhang	116
Abkürzungsverzeichnis.....	116
Verzeichnis der verwendeten Sequenzen.....	117
Literaturverzeichnis.....	118
Lebenslauf	127
Danksagung	129

Zusammenfassung

Der topologische Zustand von DNA ist eines ihrer wesentlichen Merkmale und beeinflusst sowohl den informatischen Gehalt einzelner Sequenzen auf dem Niveau der Interaktion zwischen diskreten, kurzen Basenfolgen und daran bindenden Liganden, als auch die Zugänglichkeit ganzer Chromosomenabschnitte. Im Zellkern liegt DNA topologisch fixiert vor, die Fixierung kann dabei in Abhängigkeit von ihrer morphologischen oder funktionellen Charakterisierung unterschiedlich definiert sein.

Torsionsspannung als Bestandteil der physiologischen Eigenschaften wird erst durch topologische Fixierung der DNA, meist an einer Matrix, möglich. Die Modulation des Gehaltes an Torsionsspannung, und damit an Konformationsenergie, hat Auswirkungen auf zahlreiche Aspekte der DNA im Zellkern, u.a. die Fähigkeit zur Initiation der Transkription und die Ausbildung von alternativen Sekundärstrukturen, wie Z-DNA.

In meiner Arbeit wird ein Modell vorgestellt, welches die Untersuchung von matrixgebundener, topologisch fixierter DNA durch Bindung kovalent geschlossener, linearer Moleküle an eine Oberfläche ermöglicht.

Das System wurde umfangreich durch Bindungsexperimente mit Sekundärform-spezifischen Antikörpern charakterisiert. Die Bildung von Z-DNA bei viel geringeren Unterwindungsgraden als im Plasmidsystem wird gezeigt. Die Bindungsspezifität der bindenden Antikörper sowie der Z-DNA-bindenden Domäne des RNA edierenden Enzyms dsRAD1 wurde untersucht.

Das System eignet sich zur Untersuchung der Wirkung und Inhibition von Topoisomerasen. Beispiele für Experimente mit Topoisomerasen sowie die Bildung von RNA-Schleifen als Konsequenz der Transkription in gespannter DNA werden gezeigt.

Summary

The topological state of DNA is one of the defining aspects of this molecule. It has consequences for its informatic content both on the level of single sequence:ligand interactions and the accessibility of entire chromosomal sections at large. Physiologically, DNA is topologically fixed, the nature of the fixation usually being defined by its morphological or functional characterization.

Topological fixation, by attachment to the nuclear matrix in eucaryotic cells, is a prerequisite of the modulation of torsional strain in DNA. This modulation is equivalent to a tuning of the conformational energy of the molecule. This conformational energy has ramifications for many aspects of DNA, among them the initiation of transcription and the formation of alternative secondary structures, such as Z-DNA.

A model is presented here that allows experimentation on matrix-attached, topologically fixed DNA by binding linear, covalently closed DNA molecules to a surface.

The system was characterized exhaustively using binding experiments with antibodies specific for secondary structures of DNA. The formation of Z-DNA at specific superhelical densities much lower than previously reported for the plasmid system is demonstrated. Binding specificities of different antibody preparations and the Z-DNA-binding domain of the RNA editing enzyme dsRAD1 were determined.

We show that the system is able to discriminate the activity and inhibition of different topoisomerases. The formation of RNA-loops as a consequence of transcription in torsionally strained DNA is also demonstrated.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2C10	monoklonaler Antikörper mit ds-DNA-Spezifität; Maus IgG Subtyp 2B
bp	Basenpaar, Residuen in DNA-Ketten
BSA	Rinderserumalbumin
DMAE	Dimethylaminoethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus Escherichia coli
ELISA	enzymgekoppelter Antikörperrnachweis
EtBr	Ethidiumbromid
h(0)	Ganghöhe der DNA-Helix
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSP	heat shock protein
IgG	Gamma-Immunoglobulin
IgM	Mü-Immunoglobulin
kb	Kilobase (1000Basenpaare DNA)
L	Linking Number (topologischer Parameter)
LCR	locus control region
M&M	Materialien und Methoden
MAR	matrix attachment region
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
paZz	polyklonaler anti-Z-Antikörper aus Ziege
PBS	phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
pBSKII	Plasmid Blueskript SK II (Stratagene)
PBST	PBS + 0,05% TWEEN®20 (Roth)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pME	Plasmid von Pulleyblank
POD	Peroxidase
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur (25°C)
σ	superhelikale Dichte
s.	siehe
SAR	scaffold attachment region
scs	specialized chromatin structure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK-Z1B	Konstrukt aus dem Plasmid SK-Z1 (BamHI verdaut) und dem ODN B2B
sn-RNA	small nuclear RNA
SPR	Surface Plasmon Resonance
ss	Einzelstrang
T	Twist (topologischer Parameter)
TMB	Tetramethylbenzidin
TopoI	Topoisomerase I
TopoII	Topoisomerase II
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan

ü.N. über Nacht
 W Writhe / Verwindung (topologischer Parameter)
 Z22 monoklonaler Antikörper mit vermuteter Z-DNA-Spezifität; Maus IgG Subtyp 2ß

Verzeichnis der verwendeten Sequenzen

ODN:

B1B:	GATCGGCCGG CCGTTXTCGG CCGGCC	X=Bio-dU
B2B:	GATCGGCCGG CCGXCTXCGG CCGGCC	X=Bio-dU
B1Bloop:	Bio-GATCGGCCGG CCGTTTTTCGG CCGGCC	
B2Bloop:	Bio-GATCGGCCGG CCGTCTTCGG CCGGCC	
BamT7-14	GATCAGCTAT AGTGAGTCGT TTTTACGACT CACTATAGCT	
EcoBio:	AATTGGCCGX GCCGXCTXCG GCACGGCC	X=Bio-dU
NheI:	CTAGAGCCTA CCGGXTXCCG GTAGGCT	X=Bio-dU
SacIB	CGCTAAGGCC TGACCXCXCG TCAGGCCTTA GCGAGCT	X=Bio-dU
Sk796:	TAGTGAGGGT TAATTGCGCG	
Sk796Bio:	Bio-TAGTGAGGGT TAATTGCGCG	

Plasmide:

SK: Plamid Blueskript SKII- (Stratagene)

SK-Z1: Plasmid Blueskript mit einklonierter Alu-Sequenz aus c-myc (Wölfl 1990); die Z-bildende sequenz wurde aus dem von Dr. Wölfl zur Verfügung gestellten Plasmid mit BamHI und HindIII ausgeschnitten und in Blueskript kloniert; die Fragmentsequenz lautet

```

A GCTTGATATC GAATTCCTGC AGCCCCTGCA AACTCAACGG GTAATAACCC ATCTTG
AACAG CGTACATGC TATACACACA CCCCTTTCCC CCGAATTGTT TTCTC TTTTG
GAGGTGGTGG AGGGAGAGAA AAGTTTACTT AAAATGCCTT TGGGTGAGGG ACCAA
GGATG AGAAGAATGT TTTTGTGTTT TCATGCCGTG GAATAACACA AAATA AAAAA
TCCCG AGGGA ATATACATTA TATATTAAAT ATAGATCATT TCAGGGAGCA AACAA
ATCAT GTGTGGGGCT GGGCAACTAG GGGG
  
```

Lebenslauf

geb. 19.08.65 in Berlin

Ausbildung:

1975-83 Ev. Gymnasium z. Grauen Kloster, Berlin, Abitur

1984-90 Chemiestudium TU Berlin, Diplom am Institut für Organische Chemie bei Prof.
Scherowsky

1986-87 University of Edinburgh

1989 Universidad Complutense de Madrid

1990 - 97 wissenschaftlicher Mitarbeiter in Forschung und Lehre am Institut für
Molekularbiologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin

1992-94 Zusatzstudium gewerblicher Rechtsschutz im Abendstudium an der Humboldt-
Universität Berlin

1997- Aufbaustudium Wirtschaftswissenschaften, Fernuniversität Hagen

zur Zeit ausgeübte Tätigkeit:

Geschäftsführer der Mologen GmbH und der Soft Gene GmbH, Berlin

Veröffentlichungen und Patente

Scherowsky G., B. Michalski und C. Junghans 1995, Ferroelectric Liquid Crystals containing a
Chiral β -Lactam Unit, J. Mater. Chem. 5, 2125-2130

Scherowsky G., C. Junghans, B. Michalski, A. Kaltbeitzel and R Wingen, EP 0 520 292 A1,
1992

Wittig B. und C. Junghans, Mikroprojektil für das Einbringen von Substanzen in Zellen durch
ballistischen Transfer, DE 196 48 625 A1 (13.11.1996)

Junghans C. und B. Wittig, Topologisch gespanntes DNA-Molekül, DPA 197 53 182.2-44;
dito, Topologically fixed, matrix attached DNA molecule, US 09/358499; dito, WO
99/27131

Junghans C. und M. Schroff, Darstellung von linearen kovalent geschlossenen DNA-Molekülen als Expressionskonstrukte, DE 198 26 758 (erteilt); Method to make linear, covalently closed DNA constructs, PCT EP99/04339

Junghans C. und B. Wittig, Design-Prinzip für die Konstruktion von Expressionskonstrukten in der Gentherapie, DE 197 81 267,7, PCT/DE 97/02704;

Geneit, F., R. Kunz und C. Junghans, Vorrichtung zur Beschleunigung von Partikeln auf Zellen zum ballistischen Transfer, DE 196 48 656.4

Junghans C. und M. Schroff, Kovalent geschlossenes Nukleinsäuremolekül zur Immunstimulation, DE 199 35 756.0 (27.07.1999)

Junghans C., Detektion von Hybridisierungssignalen auf Partikeln, angemeldet beim DPMA im Nov. 1999, noch ohne Aktenzeichen.

F. Schakowski, M Gorschlüter, F Risse, C Junghans, M Schroff, T Sauerbruch, B Wittig, I Schmidt-Wolf: A novel type of minimal size non-viral vector with improved safety properties for clinical trials and enhanced transgene expression: First results; (eingereicht).

F Boretti, C Leutenegger, C Mislin¹, S König, M Schroff, C Junghans, D Fehr, S Huettnner, A Habel, B Sigrist, A Aubert, N Pedersen, B Wittig, H Lutz; Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression (eingereicht).

Danksagung

Danke

für die Synthese von Plasmidpräparationen Iris Ziglowski, für die Durchführung von Sequenzierungsreaktionen Katrin Büttner, für die Synthese von Hantelkonstrukten den Kollegen der Mologen GmbH, insbesondere Gaby Glowacz, Nadine Tomschin und Melanie Rothe, für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen Gudrun Thomaschek.

Besonderen Dank schulde ich Bernadette Brzezicha, die die meisten der hier gezeigten Ergebnisse mehr als einmal erarbeitet und nachvollzogen hat.

Für Anregungen, Diskussion und Antikörper Burghardt, Jens Alfken und Dave Stollar.

Für Freundschaft, Interesse und Kollegialität allen ehemaligen und jetzigen Kollegen der Arbeitsgruppe Wittig, des Instituts und der Mologen, sowie den zahlreichen Freunden draußen.

Für Wein und Pasta: Svenno, Henning und Miguel.

Und überhaupt an Matze, Stoffel und Robbi.

Für alles was ich über Medizin weiß meinen ehemaligen Studenten.

Für die Mitarbeit an diesem Projekt Bernie, Burghardt, Gaby, Jens, Katrin, Kürsad, Matthias, Mellie, Nadine, Svenno und Wolfgang.

Für die Freiheit, immer zu tun was ich wollte, dieses und viele andere Themen, viele interessante Gespräche und die große Perspektive, Burghardt.