

Aufgabenstellung

Ziel meiner Arbeit war es, ein Modellsystem zu entwickeln, an dem DNA beliebiger Länge und Sequenz *in vitro* in topologisch Zustand untersucht werden kann. Die topologische Fixierung sollte durch Bindung der DNA an einer Matrix erfolgen. Ein solches Modellsystem könnte wesentliche Eigenschaften der im Zellkern vorliegenden DNA besser repräsentieren, als dies bei zirkulärer oder linearer DNA in Lösung der Fall ist. *In vivo* ist DNA entweder durch die Verankerung über Transkriptions-Translationskomplexe am Bakteriengenom an der Zellwand fixiert, oder im Falle eukaryonter DNA, wie einleitend dargestellt, durch Bindung an das Kernskelett.

Untersuchungen zum topologischen Zustand von DNA an zirkulären Molekülen (Plasmiden) sind bekannt. Die veröffentlichten Untersuchungen bedienen sich zur Aufklärung des topologischen Zustands der DNA vor allem der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Peck 1983). Dabei können Plasmide unterschiedlicher positiver und negativer Superhelikalität als separate Banden aufgelöst werden. Zunächst wird die Mischung aus Topoisomeren einer Agarose-Gelelektrophorese unterworfen, wobei negativ wie positiv superhelikale Plasmide aufgrund ihres geringeren Formwiderstandes schneller als relaxierte Plasmide im elektrischen Feld wandern. Danach wird das Gel in einer Lösung inkubiert, die einen Interkalator wie Ethidiumbromid oder Chloroquin enthält. Der Interkalator inseriert zwischen die Basenpaare und entwindet dabei die Helix, erhöht also den Wert von h_0 . Da Lk in einem kovalent geschlossenen Plasmid nicht veränderbar ist, führt die Aufwindung nach

$$Lk = \text{konst} = W_{r_{-Interk.}} + (n / h_{0(-Interk.)}) = W_r + T_w = W_{r_{+Interk.}} + (n / h_{0(+Interk.)})$$

$$\text{für } h_{0(-Interk.)} < h_{0(+Interk.)} \quad \Rightarrow \quad W_{r_{-Interk.}} < W_{r_{+Interk.}}$$

durch eine Verkleinerung von T_w zu einer Vergrößerung des Wertes für W_r , und damit zu einer Veränderung der Superhelikalität: negativ superhelikale Moleküle ($W < 0$) werden durch die Interkalation "entknäuel", sie laufen langsamer als vor der Interkalation. Im Falle positiv superhelikaler Plasmide erhöht sich die Anzahl an Windungen; diese Moleküle wandern noch schneller im Gel (siehe Abb. 12).

Die Verwendung zirkulärer Moleküle schränkt die Weite der experimentellen Fragestellungen allerdings ein. Eine wesentliche Beschränkung des zirkulären Systems ist, daß es entlang des Polymerrückgrats eindimensional grenzenlos ist. Vor oder hinter einer aktiven Polymerase entstehende Domänen gegensinniger Superhelikalität können z.B. durch die

Ringform zueinander diffundieren und sich dadurch kompensieren. Für Untersuchungen im Zusammenhang mit dem "Twin-Domain-Modell" wäre eine Definition der Grenzen des untersuchten Systems hilfreich. Da Superhelikalität in nicht rotationsbeschränkter DNA diffundieren kann, ist bei zirkulären Molekülen das Vorhandensein lokaler Domänen unterschiedlicher Superhelikalität bestenfalls indirekt messbar. Soweit ein experimenteller Ansatz auf die Untersuchung topologiespezifischer Eigenschaften einer bestimmten Sequenz abzielt, trifft man bei Verwendung zirkulärer DNA schnell auf das Problem, daß die verwendeten zirkulären DNA-Konstrukte zum großen Teil aus Sequenzen bestehen, die nicht untersucht werden sollen und einen unerwünschten Hintergrund der experimentellen Beobachtung bilden.

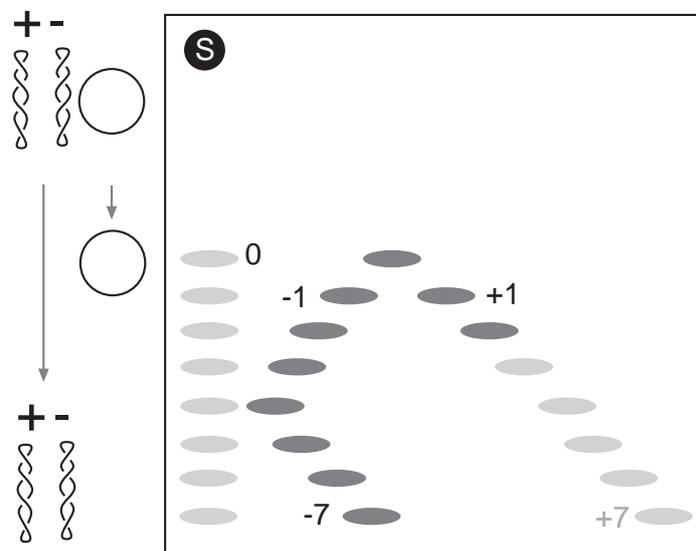


Abb. 12: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Die erste Elektrophorese verläuft vertikal (Anode unten, „S“ markiert den Startpunkt). Negativ oder positiv superhelikale Plasmide wandern wegen ihres geringeren Formwiderstandes schneller im Gel. Vor der zweiten Elektrophorese (horizontal; Anode links) werden die Plasmide mit Chlorochin inkubiert, positiv superhelikale Ringe laufen noch schneller, da sie weiter verwunden werden; negativ superhelikale Plasmide werden durch die Interkalation relaxiert. Normalerweise sind hoch positiv superhelikale Plasmide in der Präparation nicht vorhanden. Die Ziffern geben die Abweichung vom Wert des entspannten Plasmids für L an.

Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß mit der hauptsächlich gewählten Meßmethode der zweidimensionalen Gelelektrophorese nur nachträglich der erzeugte topologische Zustand der zirkulären Moleküle erfaßt werden kann, und deshalb zeitnahe oder kinetische Untersuchungen schwer zugänglich sind.

Eine Erweiterung des zirkulären Modells wäre es, an einer Stelle im ringförmig geschlossenen Molekül einen "Anker" einzuführen, der für superhelikale Zustände der DNA nicht permeabel ist, also eine Grenze zwischen topologischen Domänen darstellt. Dies könnte etwa durch die sehr starke Bindung der DNA an ein Protein erreicht werden. Dieses Protein müßte eine so hohe Masse haben, daß die durch Superhelikalität erzeugten Kräfte nicht in der Lage wären, den Anker zu bewegen. Führt man diesen Gedanken weiter, wäre der nächste Schritt, *lineare* DNA mit beiden Enden an einen Anker zu binden. Naheliegenderweise wird als Anker eine Festkörperoberfläche gewählt.

Eigene Untersuchungen

Synthesekonzept für die zu bindenden DNA-Konstrukte

Ein wesentliches beschränkendes Kriterium für die Bindung des DNA-Stranges an die Oberfläche sollte sein, daß beide Zucker-Phosphatketten jeden Endes gebunden sein müssen, da andernfalls Rotationsfreiheit der Helix besteht, die erlauben würde, daß Superhelikalität aus dem Molekül herausdiffundieren kann. Gleichzeitig sollte die Zahl der Bindungen an die feste Phase bestimmbar sein. Ansätze sind bekannt, bei denen ein Strang der DNA vom 3'-Ende her mit einer Nuklease verdaut wird, um diesen Strang dann z.B. mit biotinylierten Nukleotiden aufzufüllen, oder ein durch PCR in Anwesenheit von biotinylierten Nukleotiden hergestelltes Fragment zur Bindung ligiert wird (Cluzel 1996). Diese Methoden führen zwar zu einer topologischen Fixierung, da effektiv beide Stränge gegeneinander rotationsstabil fixiert sind, doch ist die Bindung weder in Stärke noch Ort definiert. Diese Methoden wurden zur Untersuchung des elastischen Verhaltens von DNA im Rahmen von Einzelmoleküluntersuchungen publiziert (Perkins 1994, Smith 1996).

Zur Darstellung von DNA-Molekülen definierter Bindungsstellen und rotationsfixierter Verankerung beider Stränge an beiden Enden wurde folgender Ansatz gewählt: lineare, längere (0,1 - 5 kb) doppelsträngige DNA-Stücke, die an beiden Enden Einzelstrang-Überhänge aufwiesen, wurden mit kurzen, haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (im folgenden ODN) ligiert, wobei diese Haarnadel-ODN Einzelstrang-Überhänge aufwiesen, die auf die Überhänge der längeren DNA-Stücke hybridisieren können. Bei vollständiger Ligation entstehen lineare, doppelsträngige Moleküle mit einem kovalent geschlossenen Phosphatrückgrat hantelförmiger Struktur (siehe Abb. 13). Hantelförmige Moleküle sind aus

mitochondrialen Genomen einiger Arten der Ciliatae und Hefen bekannt (Dinouel 1993); diese Moleküle sind mehrere Dutzend Kilobasen groß.

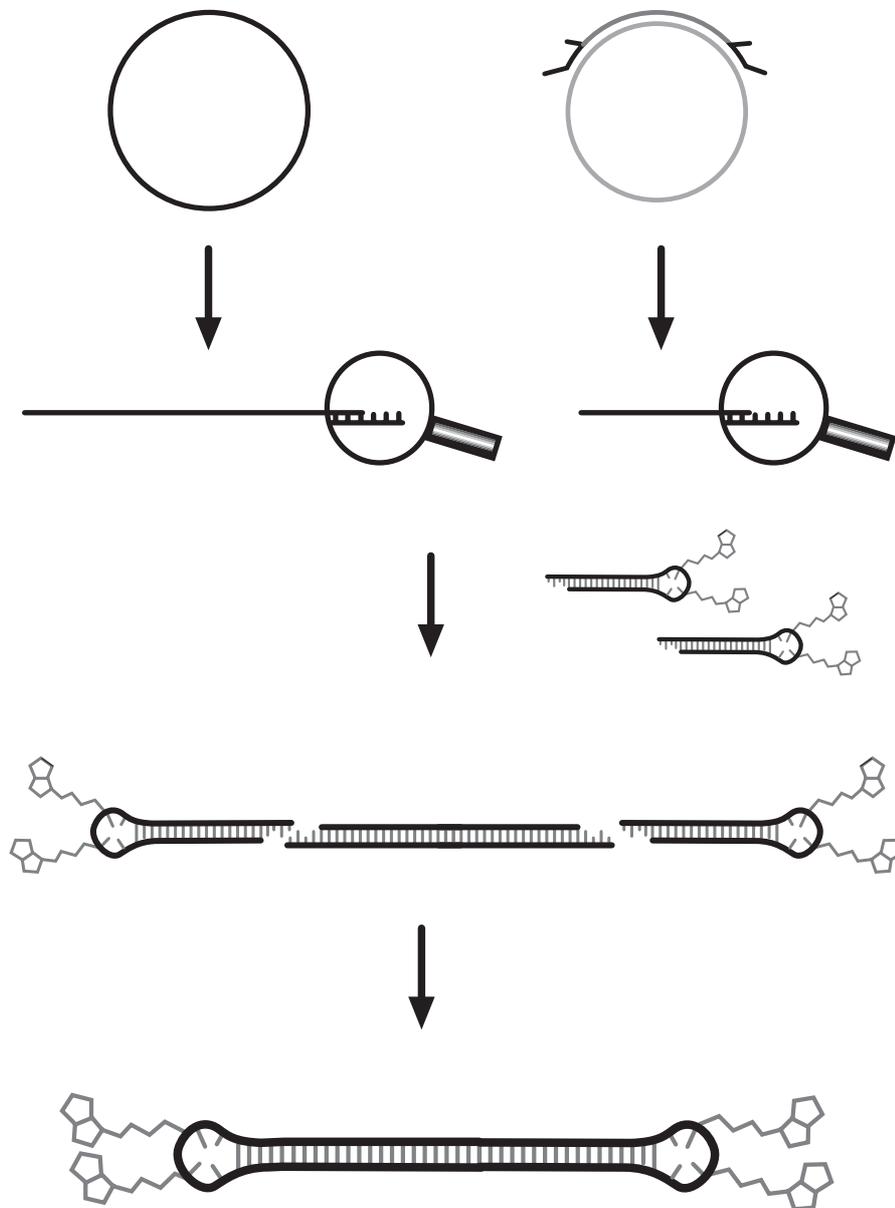


Abb. 13: Hantelkonstrukte wurden durch Ligation von längeren DNA-Fragmenten und kurzen Haarnadel-ODN gewonnen. Die Konstrukte sind schematisch dargestellt und repräsentieren nicht die tatsächliche Länge der verwendeten Moleküle; diese waren zwischen 4,5 kb und 250 bp lang. Die doppelten Fünfecke an den Enden der ODN symbolisieren die Biotin-Modifikation.

Die zur Herstellung der hier vorgestellten Hantelmoleküle verwendeten ODN sind vollsynthetisch herstellbar; bei der Synthese können Modifikationen in die Haarnadel-Schleifen eingebaut werden, die die spätere Bindung des gesamten Konstrukts an eine Oberfläche erlauben. Sind die Schleifen an beiden Enden modifiziert und das Molekül über diese Modifikationen gebunden, so ist nach den genannten theoretischen Überlegungen zu erwarten, daß ein solches Molekül topologisch fixiert vorliegen sollte.

Ergebnisse

Synthese der kovalent geschlossenen biotinylierten Hantelkonstrukte

Es wurden nach der oben geschilderten Strategie und gemäß den in „Material und Methoden“ angegebenen Synthesemethoden Hantelkonstrukte verschiedener Länge aus Plasmid-DNA hergestellt. Für die meisten Untersuchungen wurden Konstrukte verwendet, die ca. 3000 bp lang waren und aus dem Plasmid „Blueskript SKII“ von Stratagene sowie daraus hervorgegangenen Insertionsrekombinanten bestanden. Blueskript SKII hat eine Multiklonierungssequenz mit Erkennungssequenzen für zahlreiche Restriktionsenzyme sowie Promotorsequenzen für die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7.

Es wurden als ODN doppelt biotinylierte Haarnadel-ODN mit auf die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI, BamHI, NheI, SacI und AflII eingesetzt. SacI-Schnittstellen weisen einen 3'-OH-Überhang auf, auch mit diesen ODN können Konstrukte hergestellt werden, wenn auch bei enzymatischer Phosphorylierung mittels Polynukleotidkinase aus Bakteriophage T4 das Enzym langsamer arbeitet.

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 zum Einbau geeigneten Nukleosidtriphosphaten 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 und dann auf die vollständigen Hantelstrukturen angewendet. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse der PAGE-Gelelektrophorese von ligierten und nichtligierten ODN, welche mit T4 DNA-Polymerase verdaut wurden. Abb.14 A zeigt den vollständigen Verdau, (jeweils rechte Spur) offener Haarnadel ODN sowie die Beständigkeit geschlossener Moleküle gegenüber dem Enzym (1-3). Spuren 3 zeigen das Entstehen von Gemischen bei Ligation von ODN untereinander kompatibler Überhänge, und 4 den selektiven Verdau der (schwachen, unteren) Bande aus

bei Ligation mit einem unphosphorylierten Partner entstandenem („genickten“) Heterodimer mit einer Lücke im Phosphatrückgrat.

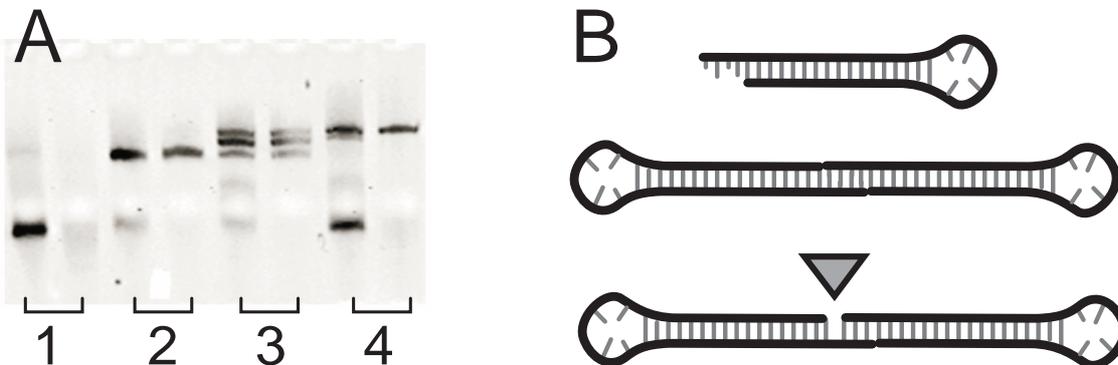


Abb. 14: Validierung der Ligationskontrolle mit ODN B2B (28-mer).

A zeigt das Ergebnis einer PAGE-Gelelektrophorese der verdauten Proben (ca. 1 μ g DNA-ODN pro Spur, Färbung mit Methylblau). Es sind nebeneinander jeweils eine unverdaute (li.) und eine mit T4-DNA-Polymerase inkubierte Probe (re.) aufgetragen. 1: unligiertes ODN; 2: ODN nach Phosphorylierung und Ligation; 3: Ligation von phosphorylierten ODN B2B und ODN BamT714, dessen Überhang mit sich selbst und mit B2B hybridisieren kann, so daß sowohl Homo- wie Heterodimere entstehen können; 4: wie 3, wobei BamT714 nicht 5'-phosphoryliert war. B: schematische Darstellung der bei dieser Reaktion auftretenden Spezies: unligiertes ODN (oben), ligiertes Hantelkonstrukt, dito mit offener Phosphatbrücke im Rückgrat (unten).

Abb. 15 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese eines 3-kb-Hantelkonstrukts. Zur Kontrolle der Funktion der Polymerase wurde das Konstrukt in Anwesenheit eines Restriktionsenzymys verdaut, für welches eine Erkennungssequenz auf dem Konstrukt vorhanden war.

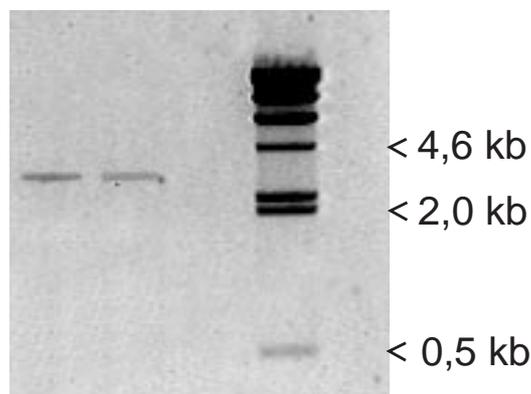


Abb. 15: Kontrolle der biotinylierten Kontrukte mit T7-DNA-Polymerase.

V.l.n.r.: je ca. 20 ng Konstrukt SKZ1-Eco roh; mit T4-DNAPolymerase verdaut; Verdau mit T4-DNA-Polymerase und BamHI; 250 ng Lambda/HindIII Marker. Das 1%-Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und ist invertiert gezeigt.

Nachweis von matrixgebundener DNA durch Antikörper

Als Nachweismethode für oberflächengebundene DNA wurde der Nachweis durch DNA-spezifische Antikörper gewählt. Gebundene DNA unabhängig von ihrem topologischen Zustand wurde mit die B-Form von DNA erkennenden Antikörpern, topologisch gespannte DNA mit Z-Form-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die an DNA gebundenen Antikörper wurden nach Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper durch Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin nachgewiesen (siehe Methodenteil).

Zum Nachweis matrixgebundener B-DNA wurde der monoklonale anti-DNA-Antikörper 2C10 (Maus IgG, Subtyp 2b) von Dr. D. Stollar (Tufts University, Boston) eingesetzt. Der einzige käuflich erhältliche anti-DNA-Antikörper, ein IgM aus Maus (Roche Diagnostics) erkennt im ELISA keine DNA, weder einzelsträngige Oligonukleotide noch längere (>3 kb) doppelsträngige DNA. Nachfragen beim Hersteller legen nahe, daß es sich um einen Kernproteine oder DNA-Nukleoproteinkomplexe erkennenden Antikörper handeln muß.

Es wurden mehrere Streptavidin-beschichtete Matrices auf Eignung untersucht. Im Vergleich mit allen kommerziell erhältlichen und selbst beschichteten Platten zeigten die ELISA-Platten der Firma Roche Diagnostics das günstigste Signal-Rauschen-Verhältnis. Die Platten haben eine Bindungskapazität von 25 ng Biotin pro well; damit liegt bei Bindung von ca. 2 ng eines 3 kb-Konstrukts die Kapazität der Platte etwa fünf Größenordnungen über der Menge an gebundenem Biotin. Die Platten sind in einer "high capacity"- sowie einer nukleasefreien Variante erhältlich. Es wurden die "high capacity" Platten verwendet, wenn nicht nukleasefreie Bedingungen für den experimentellen Ansatz erforderlich waren.

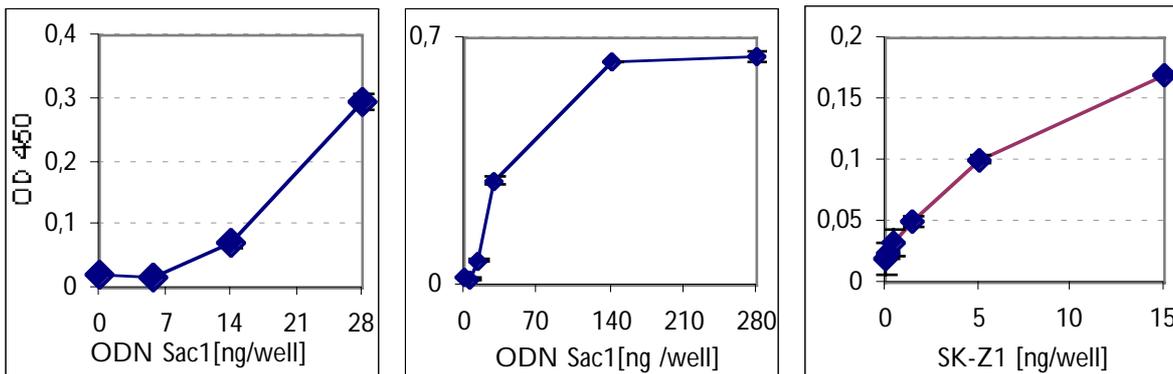


Abb. 16: Nachweis von DNA mit B-DNA-spezifischem Antikörper 2C10.

v.l.n.r.: Bindungskurve für ODN Sac1B (20 bp); die gleiche Kurve bei höheren Mengen; Bindung von beidseitig biotinylierten 3kb-Hantelkonstrukten

Die Nachweisgrenze für DNA mit 2C10 unter den gewählten Bedingungen liegt bei ca. 10 ng für das Haarnadel-ODN SacI (siehe Sequenzanhang) sowie <2 ng für das 3 kb-Hantelkonstrukt SK-Eco aus Plasmid Blueskript (siehe Abb. 16).

Bei der Bindung an längere Doppelstrang-DNA ist das Signal der 2C10-Antikörperbindung im Rahmen der Messgenauigkeit proportional zur Menge der eingesetzten DNA. Bei Verdauung matrixgebundener DNA und anschließender Inkubation mit Antikörper war das erhaltene Signal direkt proportional dem gebundenen DNA-Anteil, der auf der Platte zurückblieb (siehe Abb. 17).

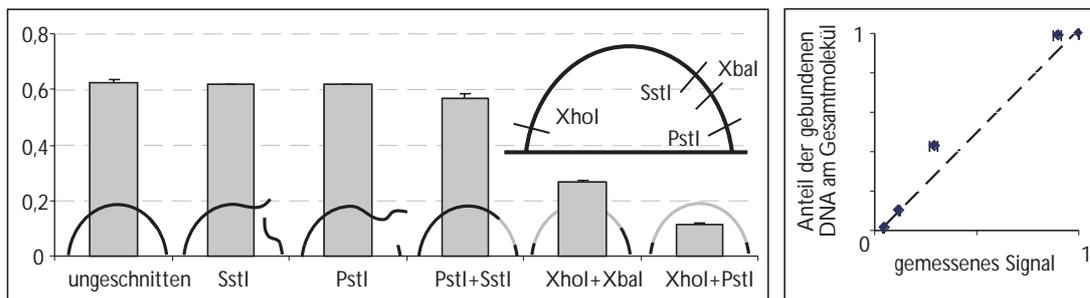


Abb. 17: Linearer Zusammenhang zwischen Antikörpersignal und DNA-Menge auf der Platte. Signal des B-DNA-spezifischen Antikörpers 2C10 nach Verdauung des 3,2 kb-Konstruktes SKZ1-Eco mit Restriktionsenzymen auf der Matrix. Rechts: das gemessene Signal als Funktion der Menge der nach dem Verdauung auf der Platte zurückbleibenden DNA

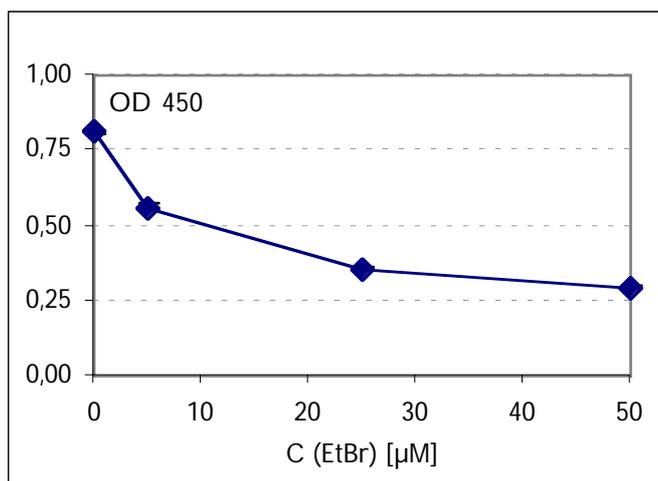


Abb. 18: Störung der B-DNA-Form durch Interkalation von Ethidium. Bindung des Anti-B-DNA-Antikörpers 2C10 an matrixfixierte DNA in Abhängigkeit von der Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA während der Antikörperbindung

Es wurde die Bindung von 2C10 an Konstrukte, die an beiden Seiten über Biotinreste an die Matrix gebunden waren, in Anwesenheit des Interkalators Ethidiumbromid gemessen. Die Anwesenheit von Ethidiumbromid während der Antikörperinkubation senkt die Fähigkeit des Antikörpers, an das Konstrukt zu binden. Abb. 18 zeigt die Bindungskurve.

Das DNA-mengenabhängige Signal des Antikörpers 2C10 war auch bei Waschbedingungen wie 30% Isopropanol oder 50 mM NaOH oder 2 M Guanidiniumhydrochlorid beständig. Mehrfaches Waschen mit physiologischem Puffer störte die Bindung nicht. Das topologieabhängige Signal des Z-DNA-spezifischen Antikörpers Z22, gleichermaßen ein Signal für die Integrität aller Bindungen der DNA an die Oberfläche und der Integrität des Phosphatrückgrates (siehe unten), widersteht sogar der Waschung mit 0,1 M HCl (nicht gezeigt).

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

Für die ersten Versuche zur Erzeugung von topologie-abhängigen DNA-Strukturen wurden 3 kb lange Konstrukte aus dem Plasmid Blueskript SK (pSK-Z1-EcoB, s. Sequenzanhang) verwendet. Es wurde mit 20 μ M Ethidiumbromid interkalierte und nicht interkalierte, kovalent

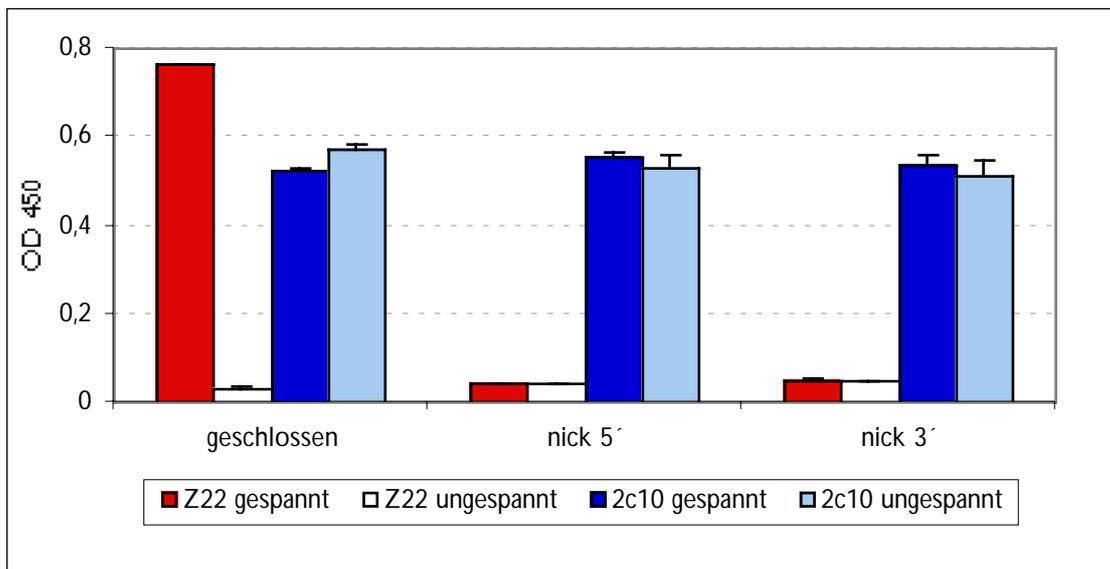


Abb. 19: Antikörperbindung an matrixfixierte gespannte bzw. ungespannte DNA.

V.l.n.r. 1. Bindung von Anti-Z-DNA mAb Z22 an gespannte DNA (20 μ M EtBr während der Bindung der DNA an die Matrix); 2. Z22 an ungespannte DNA; 3. Anti-B-DNA mAb an gespannte; 4. an ungespannte DNA. Die linken Daten wurden mit hantelförmiger DNA mit intaktem Phosphatrückgrat; die mittleren und rechten mit an 5'-OH des ODN oder 5'-OH des Vektorrückgrats dephosphorylierten Konstrukten erhoben.

geschlossene biotinylierte DNA auf den Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten gebunden. Nach Waschen der gebundenen DNA zur Entfernung des Ethidiums wurden die Platten mit monoklonalem anti-Z-DNA-Antikörper Z22 (Lafer 1981) inkubiert. Die Höhe des Sekundärantikörpersignals war abhängig von der vorherigen Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA. DNA-Konstrukte, die eine nicht-kovalent-geschlossene Lücke im Phosphatestrückgrat aufwiesen, zeigten kein Signal, das stärker war als die Kontrolle ohne gebundene DNA (Abb. 19).

Die Kontrollen mit Bruch im Phosphatestrückgrat wurden durch Ligation der Rumpf-DNA mit nichtphosphorylierten Haarnadel-ODN hergestellt. Da die ODN nach der Phosphoamidit-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 der Polymerase 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 sind ebenfalls durch Exonukleaseaktivität verdaubar.

Es wurde untersucht, ob Konstrukte das selbe Ethidium-abhängige Signal zeigen, wenn sie mit ODN hergestellt worden waren, die nur einen Biotinrest an jeder Seite des Moleküls einführen. Dies ist nicht der Fall; Abb. 20 zeigt das Ergebnis.

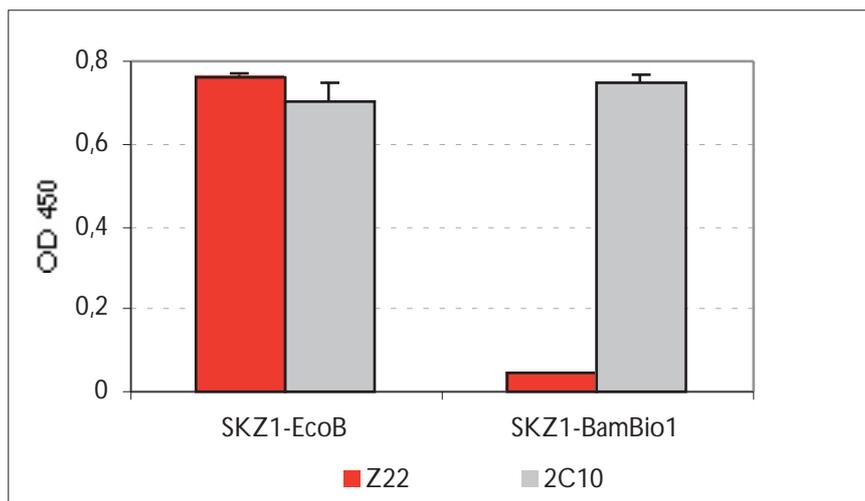


Abb. 20: Antikörperbindung an matrixfixierte, gespannte DNA.

Bindung von Anti-Z-DNA mAb Z22 (I.) und anti-B-DNA mAb 2C10 an mit mit 20 μ M EtBr gespannte 3 kb-Hantelkonstrukte mit zwei (SKZ1-EcoB) und einem (SKZ1-BamBio1) Biotin pro Hantelende.

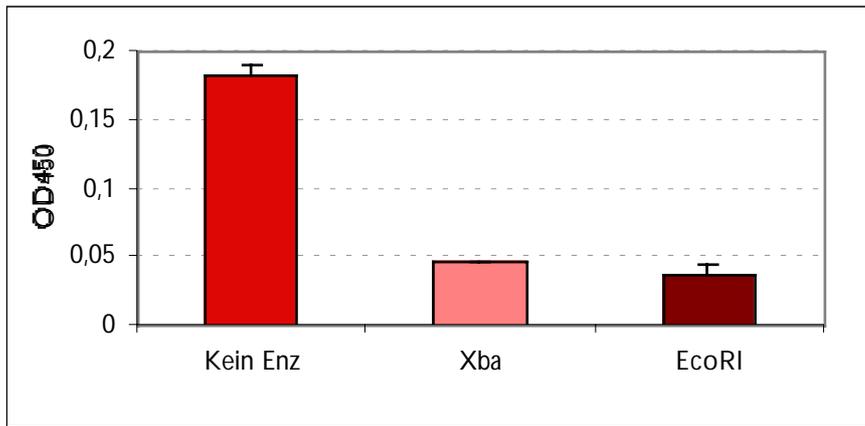


Abb. 21: Bindung des mAb Z22 an DNA nach Verdau mit Restriktionsenzymen.

3 kb-Konstrukte wurden vor der Bindung der DNA an die Matrix mit je 10 u Enzym verdaut und in Anwesenheit von 20µM Ethidium gebunden.

Auch wurde untersucht, ob das Konstrukt noch das Z22-Signal zeigt, wenn es vor der Bindung an die Matrix mit Restriktionsenzymen verdaut wurde. Dies ist ebenfalls nicht der Fall (s. Abb. 21).

Die Abhängigkeit der Stärke des Z22-Signals von der Konzentration des Ethidiumbromids während der Bindung für die 3 kb-Hantelkonstrukte ist in Abb. 22 dargestellt.

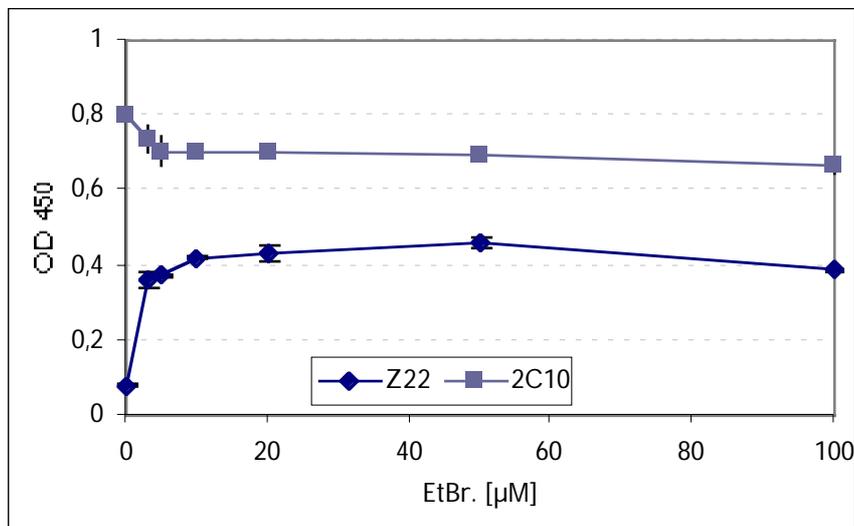


Abb. 22: Abhängigkeit von Antikörperbindung und Vorspannung.

Bindung des Z-DNA-spezifischen mAb Z22 und des B-DNA-spezifischen mAb 2C10 an matrixfixierte DNA (3 kb-Konstrukte) in Abhängigkeit von der Konzentration des Ethidiums während der DNA-Bindung an die Matrix.

Es wurden Proben der selben Konstrukt-Stammlösung unterschiedlich lange auf der Matrix inkubiert. Dies sollte eine Abschätzung des durch geringfügige Änderungen der Bindungsinkubationszeit hervorgerufenen Fehlers im Signal und damit die Bestimmung der optimalen Bindungszeit ermöglichen (s. Abb. 23). Es wurde dem Ergebnis entsprechend für alle DNA-Bindungen grundsätzlich mindestens eine Bindungszeit von 45 min gewählt.

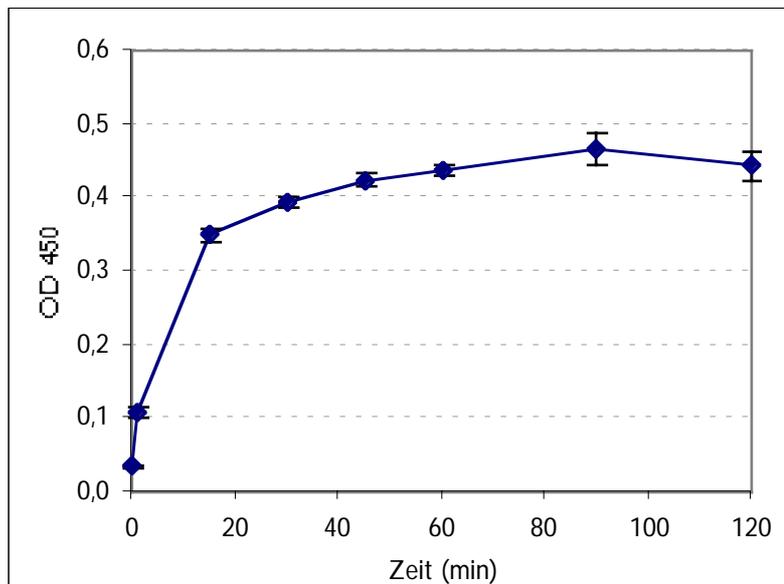


Abb. 23: Abhängigkeit des Signals von der Bindungszeit der DNA.

Bindung des B-DNA-spezifischen mAB 2C10 an matrixfixierte 3-kb-Konstrukte.

Nicht alle Moleküle einer Präparation sind kovalent geschlossen und tragen zum topologieabhängigen Signal bei. Um das Problem zu umgehen, das die schwankenden Anteile nicht-kovalent geschlossener Moleküle in den DNA-Präparationen bei quantitativen Z22-Messungen aufwerfen, wurde untersucht, ob sich dieser Teil der Präparation durch Verdau mit T4-DNA-Polymerase vollständig aus der Präparation entfernen lässt, wie es ja die Annahme war, die zur Benutzung dieser Enzymfunktion als Qualitätskontrolle bei der Präparation geführt hatte. Theoretisch sollte der Anteil der Präparation, der zu einem Z22-Signal führt, gegen den T4-DNA-Polymeraseverdau resistent sein. Bei Verdau sollte man zeitabhängig also ein konstantes Z22-Signal sehen, während das anti-DNA-Signal um den Betrag abnehmen sollte, der dem verdauten Teil der Präparation entspricht. Dies ist der Fall, die Abnahme des 2C10-Signals entspricht dem Verlauf der Dichtefunktion bei densitometrischer Analyse der Banden der Verdaureaktionen auf dem Agarosegel. Die Anti-Z-Signalstärke bleibt hingegen im Zeitverlauf konstant (siehe Abb. 24).

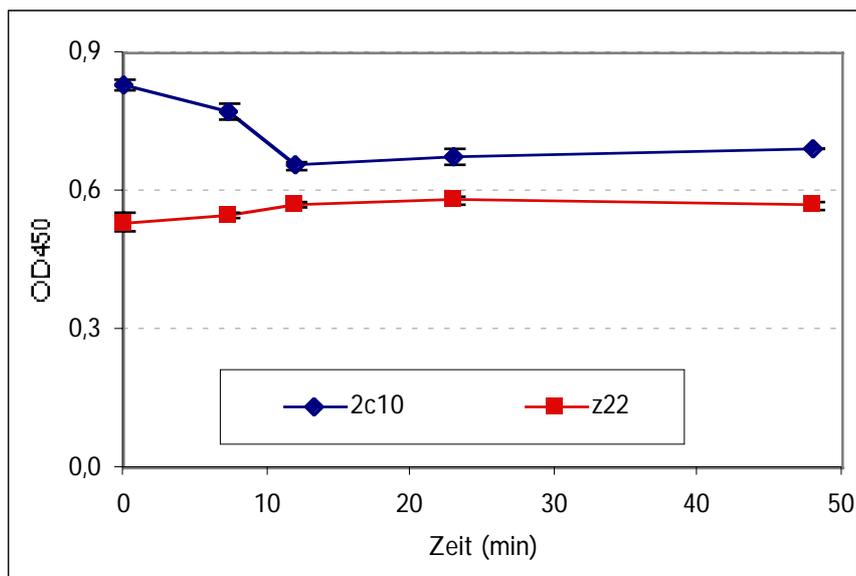


Abb. 24: Exonukleaseverdau der Hantelkonstrukte.

Signal von 2C10 und Z22 an mit 10 μ M Ethidium vorgespannten, vor Bindung an die Matrix mit T7 DNA-Polymerase-Exonuklease verdauten Konstrukten in Abhängigkeit von der Dauer des Verdau.

Es wurde vorgespannte DNA auf der Platte mit Restriktionsenzymen verdaut. In Abhängigkeit von der Präsenz von geeigneten Erkennungssequenzen ging das Signal nach Verdau *in situ* stark zurück (siehe Abb. 25).

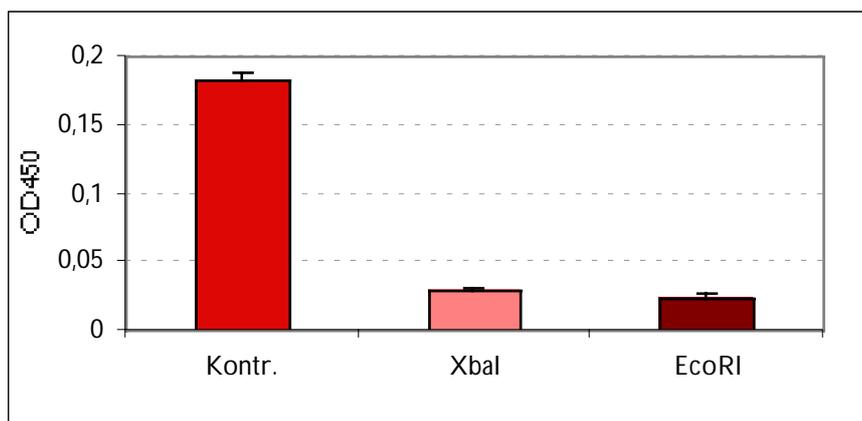


Abb. 25: Endonukleaseverdau in situ.

Bindung des Z-DNA-spezifischen mAB Z22 an matrixfixierte, mit 20 μ M Ethidium gespannte DNA-Konstrukte (SKZ1-BamEcoB) nach 30 min Verdau mit je 10 u Enzym in-situ.

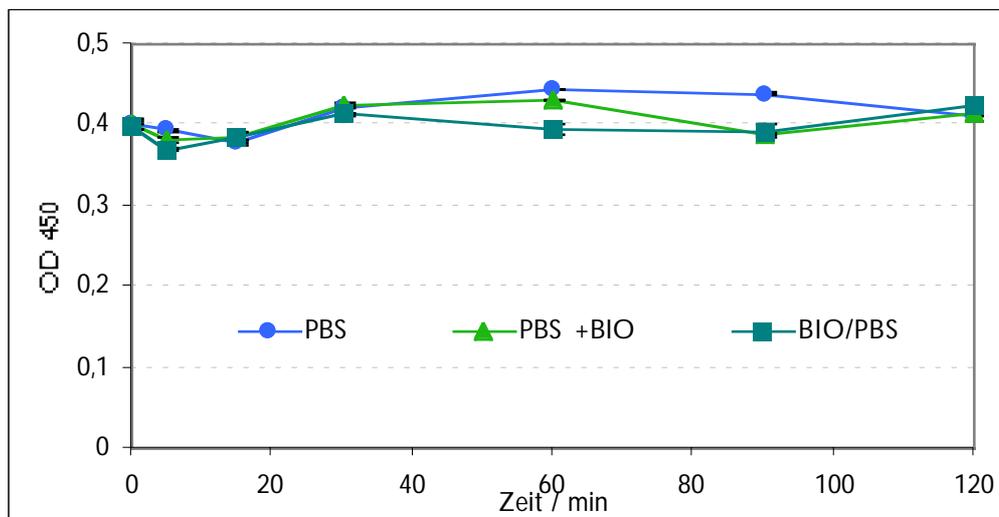


Abb. 26: Stabilität der topologischen Fixierung in Lösung.

Bindung des Z-DNA-spezifischen mAB Z22 an matrixfixierte, mit 20 μ M Ethidium gespannte DNA (SKZ1-BamEcoB) in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation der gespannten DNA mit Puffer. Die Inkubation erfolgte in PBS, in 1 mM Biotin enthaltendem PBS (PBS+Bio) oder erst für < 1 min in 1 mM Biotin und dann nach Waschung in PBS.

Zur Untersuchung der Stabilität des induzierten Signals von Z22 über die Zeit wurde die durch Bindung in Anwesenheit von Ethidium gespannte DNA mit PBS oder einer 1 mM Biotinlösung inkubiert. Außerdem wurde die DNA einmal mit Biotin gewaschen und dann mit Puffer inkubiert. Abb. 26 zeigt das Ergebnis.

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurden die Mikrotiterplatten mit gespannter DNA verschieden lange bei 50°C inkubiert (siehe Abb. 30). Bei dieser erhöhten Temperatur tritt ein signifikanter initialer Abfall des Signals auf, der aber bei weiterer Inkubation nicht weiter zunimmt.

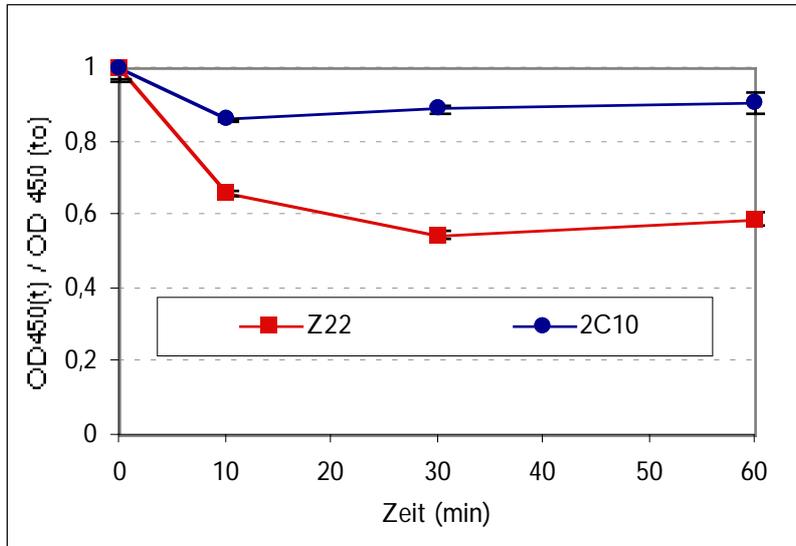


Abb. 27: Temperaturstabilität der Torsionsspannung.

Durch 20 μM Ethidium vorgespanntes 3-kb Konstrukt SKZ1-Bam2bio wurde bei 50°C in Puffer inkubiert und Torsionsspannung wurde mit Z22 ermittelt. Zum Vergleich ist der Verlauf des anti-B-DNA Signals gezeigt. Die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit auf den Wert bei $t=0$ normiert.

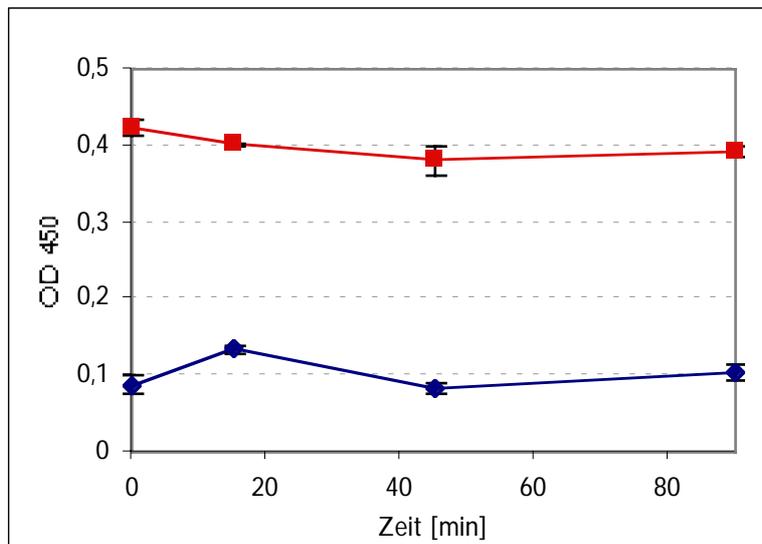


Abb. 28: Stabilität des topologisch ungespannten Zustands bei Inkubation mit Ethidium.

Veränderung des Z22-Signals ungespannter DNA (3kb-Konstrukt SKZ1-Bam2bio) nach Inkubation der gebundenen DNA mit 20 μM Ethidium über 30 min (Dreiecke). Zur Orientierung ist der Verlauf des Signals von einer gleichen Menge mit 20 μM Ethidium vorgespannter DNA und deren Inkubation in Puffer ohne Ethidium (Quadrate; analog dem in Abb. 28 gezeigten Vorgehen) dargestellt.

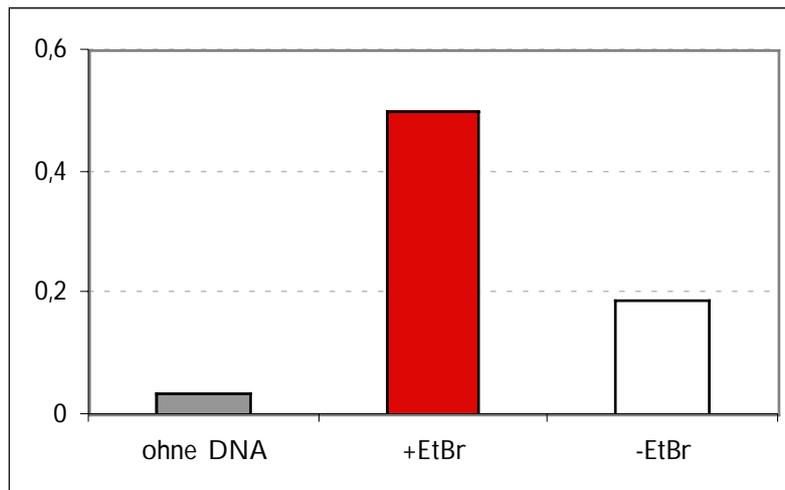


Abb. 29: Bindung des Antikörpers Z22 an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel (Dynabeads, Dynal, Oslo), anschließender Nachweis durch Inkubation der Mikropartikel in TMB-Substratlösung und photometrischer Messung analog dem ELISA-Verfahren. Die Werte wurden nur einfach bestimmt.

DNA wurde ebenfalls an Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel ("Dynabeads"; Dynal, Oslo) gebunden und mit Z22 und POD-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Erwartungsgemäß zeigte sich ein dem Experiment mit Mikrotiterplatten analoges Ergebnis (siehe Abb. 31).

Bindung des Antikörpers Z22 an ODN

Bei Experimenten zur Z22-Bindung mit einer versehentlich durch Haarnadel-ODN-Dimere verunreinigten DNA-Präparation zeigte sich, daß dieser Antikörper an Dimere unabhängig von deren Vorspannung durch Interkalation bindet. Dieser Befund ist insofern überraschend, als nicht zu erwarten war, daß die kurzen Haarnadelstrukturen in Z-Form vorlagen, und die Spezifität des Antikörpers für das Zucker-Phosphatrückgrat der Z-DNA-Struktur hinlänglich belegt ist (Sanford 1990). Es wurden daraufhin alle vorhandenen biotinylierten ODN auf ihre Fähigkeit untersucht, Z22 zu binden. Gleichzeitig wurde zum Vergleich die Bindung des Antikörpers 2C10 (s.o.) an die betreffenden ODN geprüft. Eine Auswahl der beobachteten Signale nach Bindung an gleiche Mengen ODN (in Mikrogramm) ist in Abb. 30 dargestellt.

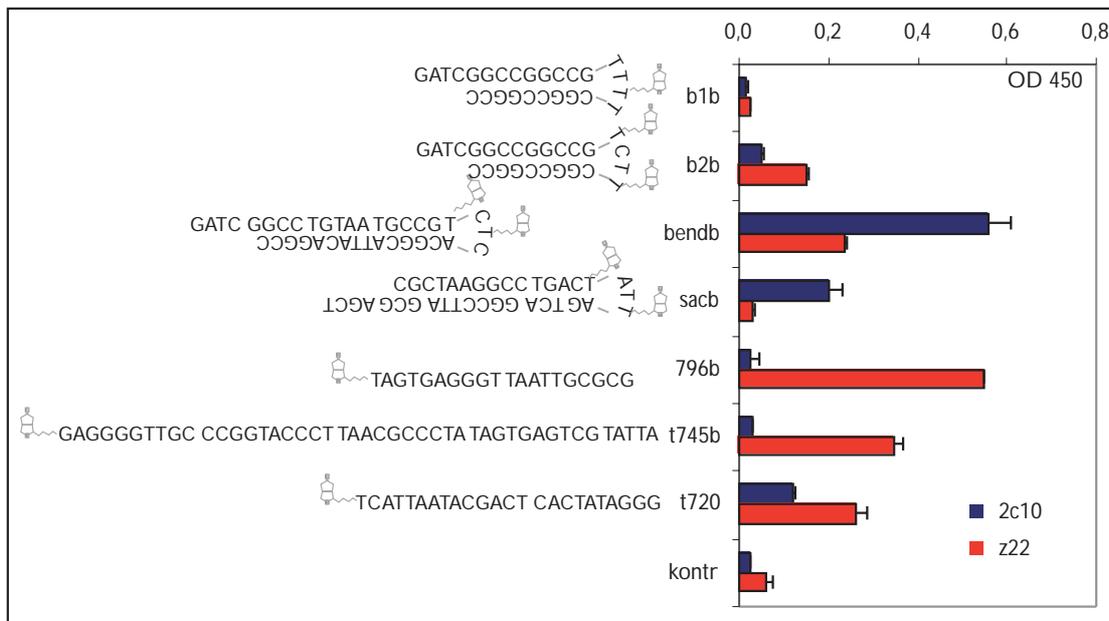


Abb. 30: Bindung der Antikörper Z22 und 2C10 an biotinylierte ODN. Kontrolle: kein ODN

Für die ODN B1B und B2B, an die Z22 unterschiedlich stark bindet (s. Abb 30 oben) wurden Sequenzvariationen der gleichen Basenfolge, aber mit nur einem Biotinrest am 5'-Ende des Moleküls hergestellt. Abb. 31 zeigt das Ergebnis des Bindungsexperiments.

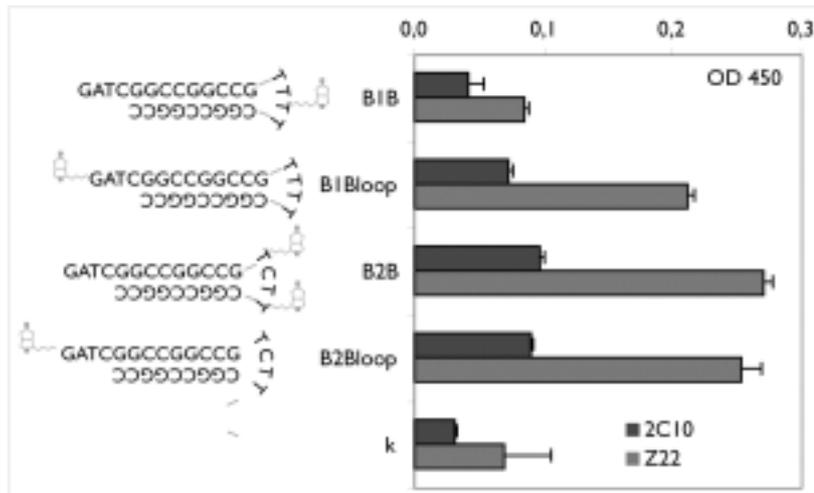


Abb. 31: Bindung der Antikörper Z22 und 2C10 an biotinylierte ODN gleicher Sequenz, aber unterschiedlicher Biotinylierung. Kontrolle: kein ODN

In einem parallelen Versuch wurde geprüft, wie weit Phosphorylierung des 5'-OH oder Ligation des 5'-Überhanges mit komplementären ODN die Bindungsfähigkeit der beiden geprüften Antikörper zu ändern vermag. Phosphorylierung allein verändert die Bindungsfähigkeit für beide Antikörper nicht; die Ligation mit sich selbst ebenfalls nicht (s. Abb. 33; die Vollständigkeit der Ligation wurde jeweils per PAGE überprüft; das korrespondierende Gelbild für diesen Versuch ist in Abb. 14 gezeigt). Die Ligation des biotinylierten ODN mit einem nicht-biotinylierten ODN (T714) etwas längerer Stammregion (18 bp, siehe zweiten Wert von unten in Abb. 35) hingegen führt zu einer erheblichen Erhöhung der Bindungsfähigkeit von 2C10 und gleichzeitig zu einer Reduktion der Z22-Bindung auf Werte im Bereich der Kontrolle ohne ODN. Die Ligationen wurden mit Überschuss des nichtbiotinylierten ODN durchgeführt, um die Bildung von B2B-Homodimeren zu unterdrücken. Das nicht-biotinylierte Homodimer, welches bei der Reaktion ebenfalls gebildet wird, kann nicht an der Platte binden und damit nicht zum Signal beitragen.

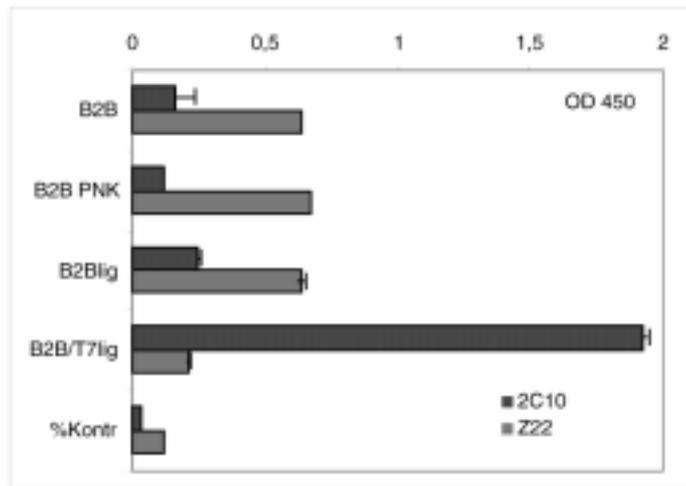


Abb. 32: Bindung der Antikörper Z22 und 2C10 an das biotinylierte ODN B2B in Abhängigkeit von dessen Modifikation am 5'-OH. B2B: unmodifiziertes ODN; B2B PNK: 5'-phosphoryliertes ODN; B2Blig: mit sich selbst ligiertes ODN; B2BT7Lig: mit nicht-biotinyliertem ODN ligiertes B2B; Kontr: keine DNA

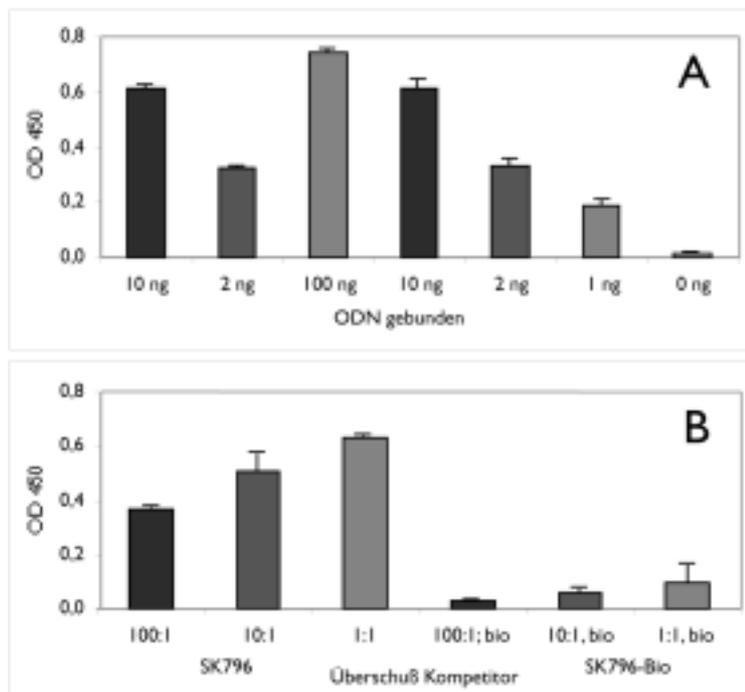


Abb. 33: Bindung von Z22 an mit ODN sk796-Bio beschichtete Platten. A: Bindung an unterschiedliche Mengen ODN; B: Konkurrenz von 10 ng gebundenem ODN mit ODN gleicher Sequenz. Details s. Text

Die höchste Affinität zeigte Z22 zu einem linear-einzelsträngigen, 5'-biotinylierten 20-mer „sk796Bio“, welches als PCR-Primer synthetisiert worden war (s. Abb 30). Es wurde ein ODN gleicher Sequenz, jedoch nicht biotinyliert, synthetisiert. Die Bindung von Z22 an die mit sk796-Bio beschichtete Platte in Abhängigkeit von der Menge gebundenen ODN ist in Abb. 33 A gezeigt; die beiden linken Säulen zeigen die Bindung für solche Platten, bei denen nach Bindung des ODN die noch freien Streptavidin-Bindungsstellen mit freiem Biotin gesättigt worden waren. Abb. 33 B zeigt die Konkurrenz von gleichen Mengen (10 ng) gebundenen ODN sk796-Bio auf Biotin-gesättigten Platten mit unterschiedlichen Mengen biotinylierten (rechts) und nicht-biotinylierten ODN sk796. Es wird deutlich, daß nur das biotinylierte ODN ein guter Kompetitor ist. Das biotinylierte ODN kompetiert sogar sehr effektiv im Verhältnis 1+1, dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein kinetisches Phänomen, durch welches das frei diffusible ODN eine höhere effektive Konzentration hat als das an der Plattenoberfläche gebundene.

Bindung von Z-DNA spezifischem polyklonalen Antikörper

Die Abhängigkeit der Bindung von Z-DNA-spezifischen Liganden an DNA von deren Vorspannung wurde mit polyklonalem Antikörper aus Ziege (im folgenden: „paZz“; Geschenk von Dr. Dave Stollar, Tufts University) überprüft. Abb. 34 zeigt das Ergebnis der Bindung von paZz an 3 kb-Konstrukte in Abhängigkeit von der Konstitution des DNA-Rückgrats und der Konzentration des Ethidiums während der Bindung.

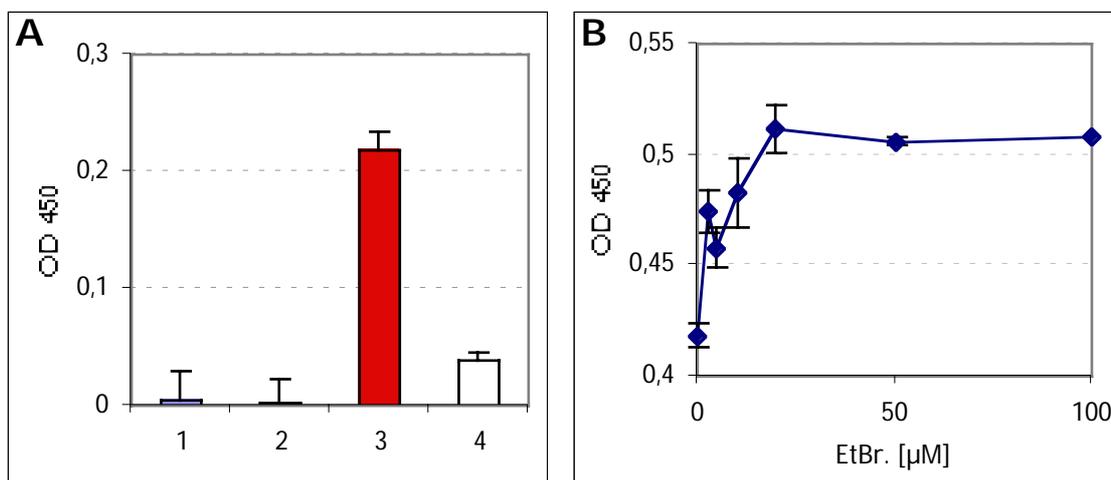


Abb. 34: Bindung von polyklonalem Z-DNA-spezifischem Antikörper paZz an 3 kb-Konstrukte

A: Signal an mit 10 μ M Ethidium vorgespannter und dann 1) mit Topoisomerase I bei 37°C 30 min behandelte; 2) mit 10u BamHI verdauter; 3) mit Puffer behandelte; 4) ungespannte DNA; B: Abhängigkeit des Signals von der Ethidiumkonzentration. Die Werte für A und B wurden unabhängig voneinander aufgenommen. Verwendete DNA: SKZ1-EcoBio.

Abhängigkeit der Antikörperbindung von Sequenz und Konstruktlänge

Es wurde die Bindung von Z22 an verschiedene 3 kb-Plasmidkonstrukte untersucht, wobei diese in ihrer Sequenz Insertionen aufwiesen, die eine unterschiedliche Neigung zum Übergang in die Z-Konformation zeigen sollten. Es wurden Konstrukte aus einem pBR322-Derivat verwendet, aus welchem Z-DNA-bildende Sequenzen, soweit erkennbar, entfernt worden waren und in welches mehrere $(YpR)_n$ Sequenzabschnitte kloniert worden waren (pME-A, in der Literatur auch als pDPL bekannt, pME-A:kein Insert; pME-C: $(TG\bullet AC)_{30}$; pME-E5: $(CG)_5$; pME-E11: $(CG)_{11}$ (Haniford 1983)). Ein Unterschied im beobachteten Signal von Z22 in Abhängigkeit von der ethidiuminduzierten Torsionsspannung im Konstrukt konnte allerdings nicht beobachtet werden (s. Abb. 35).

Kürzere Konstrukte wurden durch PCR Amplifizierung der die Insertionsstelle der $(YpR)_n$ -

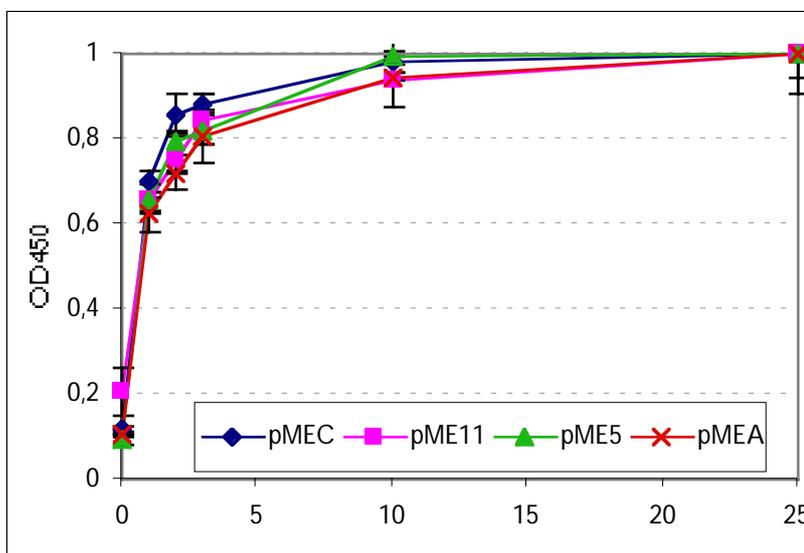


Abb. 35: Bindung von Z22 an 3 kb-Konstrukte pME-BamBio mit verschiedenen Inserts in Abhängigkeit von der Ethidium-induzierten Torsionsspannung. pME-A: kein Insert; pME-C: $(TG\bullet AC)_{30}$; pME-E5: $(CG)_5$; pME-E11: $(CG)_{11}$ (Haniford 1983). Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Werte auf den Wert jedes Konstruktes bei 25 μ M normiert.

Sequenzen flankierenden 280 bp mit Restriktionsschnittstellen enthaltenden Primern hergestellt. Die Konstrukte wurden auf die Bindung von Z22, des polyklonalen anti-Z-Antikörper aus Ziege paZz sowie einem weiteren Z-DNA-bindenden Protein, der $Z\alpha$ Domäne aus der doppelsträngige RNA edierenden Desaminase dsRAD1 (s.o.), untersucht (s. Abb. 36). Es war kein Unterschied in der Bindung von Z22 an die verschiedenen Konstrukte festzustellen.

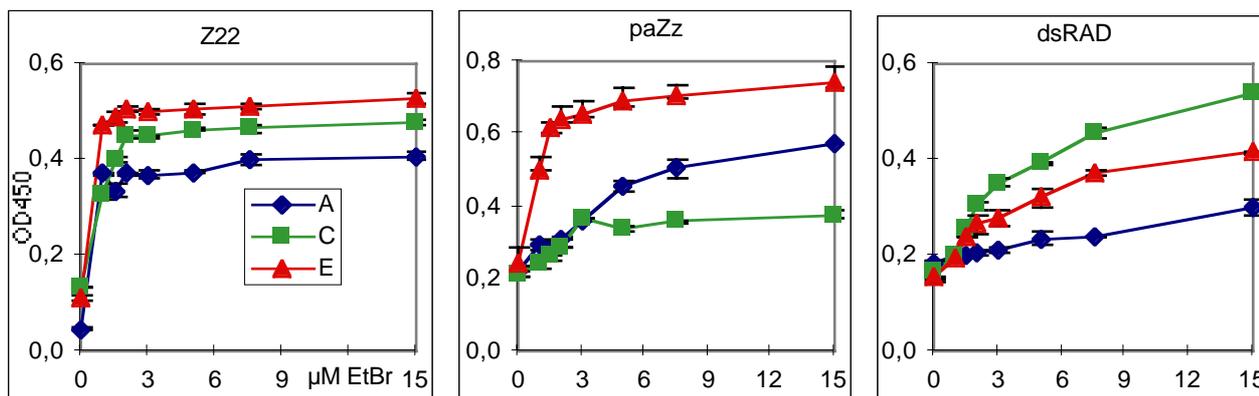


Abb. 36: Bindung von Z22, paZz sowie der $Z\alpha$ Domäne aus dsRAD1 an 280bp(+Insert)-Konstrukte pcr-EcoBio in Abhängigkeit von der Ethidium-induzierten Torsionsspannung. pME-A:kein Insert; pME-C: $(TG\cdot AC)_{30}$; pME-E: $(CG)_{11}$. Das $Z\alpha$ -Protein wurde über einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen und nachfolgende Farbreaktion mit Peroxidase-gekoppeltem Kaninchen-Fc-spezifischem Antikörper nachgewiesen (s. M&M)

Es wurden mehrere von Dr. Alfken im Zusammenhang eines Selektionsexperimentes zur Bindung von dsRAD1- $Z\alpha$ an DNA isolierte Sequenzen in pME kloniert und aus diesen Konstrukten 280 bp-PCR Fragmente amplifiziert, in deren Mitte die selektierten Sequenzen lagen. Die erhaltenen kurzen Hanteln wurden unter Spannung gebunden und auf ihre Bindung an Z22, paZz und dsRAD1- $Z\alpha$ untersucht (s. Abb 37). Die insertierten Sequenzen waren GCGCGCGCGGGCTCCT (M10) und CGCGCCCGTGTGCA (M11) (in Phase der $(YpR)_n$ -Folge stehende Basen sind unterstrichen). Einen Vergleich der Bindung von paZz und Z22

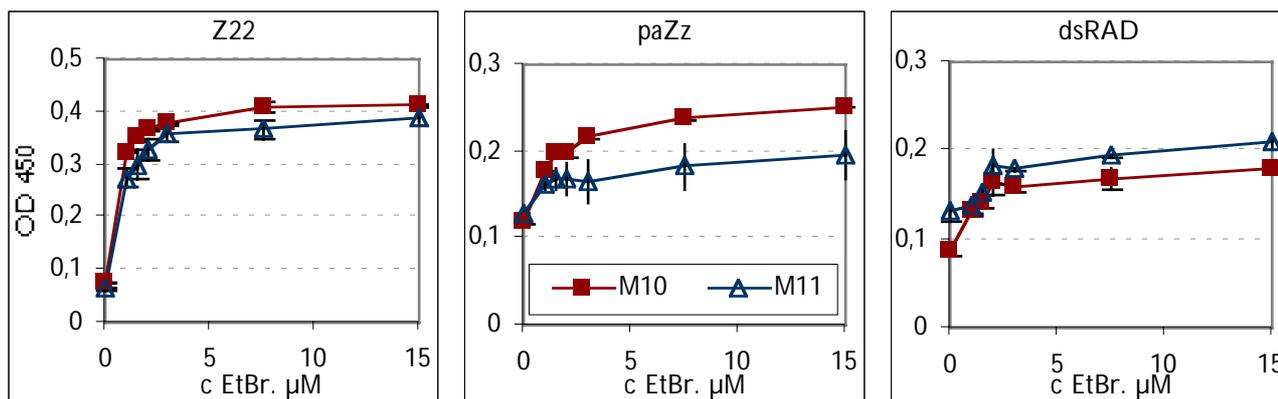


Abb. 37: Bindung von Z22 und paZz sowie der $Z\alpha$ Domäne aus dsRAD1 an 280bp(+Insert)-Konstrukte pcr-EcoBio in Abhängigkeit von der Ethidium-induzierten Torsionsspannung. GCGCGCGCGGGCTCCT (M10) und CGCGCCCGTGTGCA (M11)

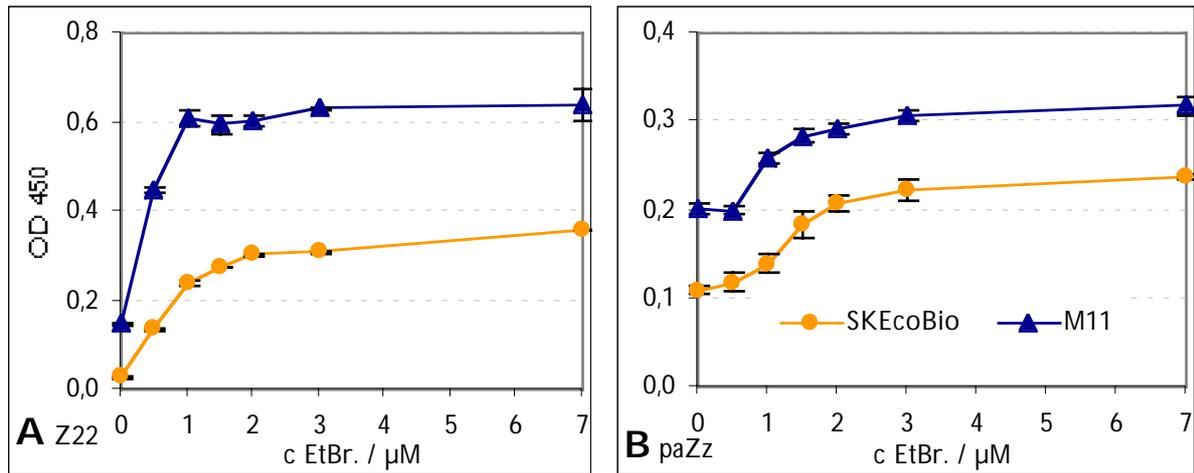


Abb. 38: Bindung von Z22 und paZz an 3 kb-Konstrukte SKecoBio und kurze 290 bp-Konstrukte M11.

an verschieden lange Konstrukte zeigt Abb. 38.

Kompetition von Z22 mit paZz

Es wurden gespannte 3-kb-Konstrukte mit paZz und Z22 zusammen inkubiert. Die Bindung von Z22 wurde mit anti-Maus-POD nachgewiesen. Abb. 39 zeigt die Ergebnisse der Inkubation mit variierender Spannung der DNA und gleichen Konzentrationen Antikörper,

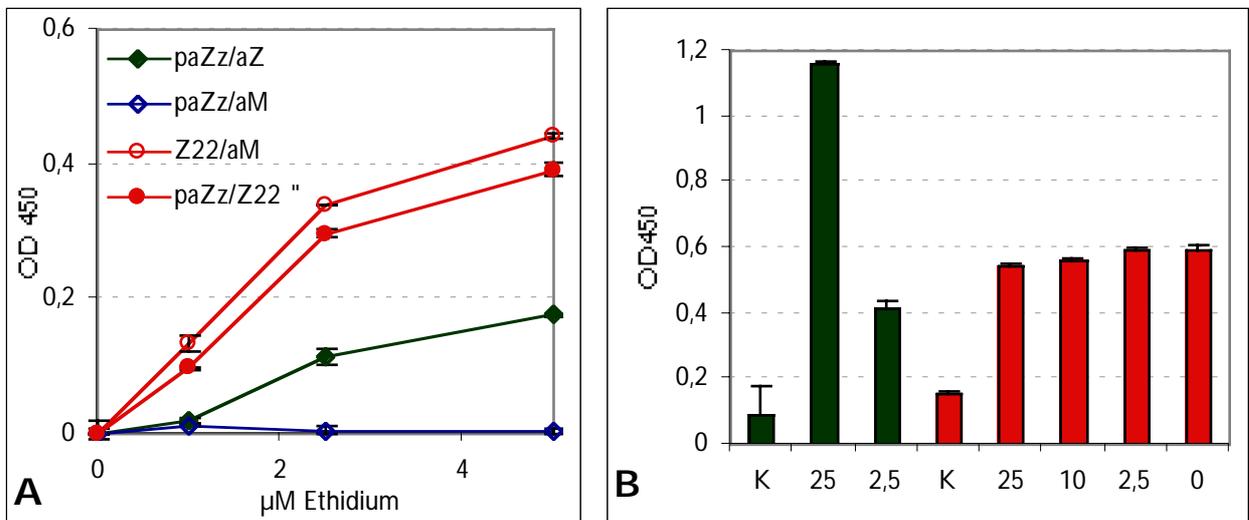


Abb. 39: Bindung von Z22 und paZz an 3 kb-Konstrukte SKecoBio. A: Konkurrenz zwischen den Antikörpern bei gleicher Antikörperkonzentration. Nachweis von Z22 (leere Kreise), Z22, paZz (volle Kreise) und paZz (leere Karos) mit anti-Maus-POD-konjugiertem Sekundär-antikörper; Nachweis von paZz mit anti-Ziege-POD-konjugiertem Sekundärantikörper (volle Karos). B: Konkurrenz von Z22 und paZz auf mit gespanntem 3 kb-Konstrukt bei variierender Konzentration des paZz. Die Subskripte beziehen sich auf die Konzentration des paZz in $\mu\text{g/ml}$. Z22 wurde in gleichbleibender Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die dunklen Balken sind Kontrollen, in denen nur paZz eingesetzt und mit anti-Ziege-Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

sowie mit variierender Menge paZz.

Untersuchung der Aktivität von DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus

Mit 15 μM Ethidium gespannte 3-kb-Konstrukte wurden mit Topoisomerase aus Kalbsthymus inkubiert. Die Enzymaktivität vermochte das Z22-Signalauf Kontrollwerte zu reduzieren. Bei Behandlung ungespannter Konstrukte mit Topoisomerase I in Anwesenheit von Ethidium wurde die Induktion eines Z22-Signals beobachtet (s. Abb. 40)

Es wurde zeitabhängig die Abnahme des spannungsinduzierten Signals für mit 15 μM gespannte Konstrukte von 3 kb und 290 bp Länge nach Einwirkung gleicher Konzentrationen Topoisomerase I untersucht. Die längeren Konstrukte zeigen eine erheblich schnellere Relaxation (s. Abb. 41).

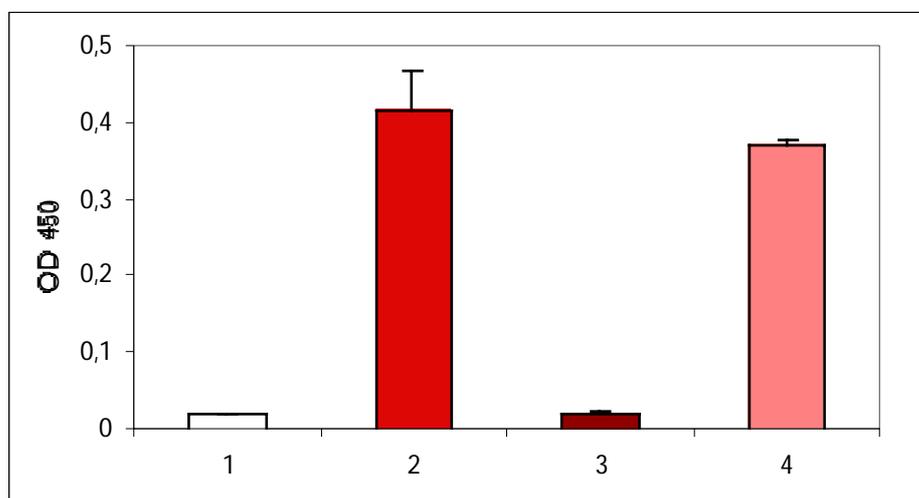


Abb. 40: Wirkung von DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus auf matrixfixierte DNA: 1: ungespannte; 2: gespannte 3 kb-Konstrukte; 3: gespannte DNA nach Einwirkung von TopoI; 4: ungespannte DNA nach Einwirkung von TopoI Ethidium enthaltendem Puffer. (Nachweis durch Z22)

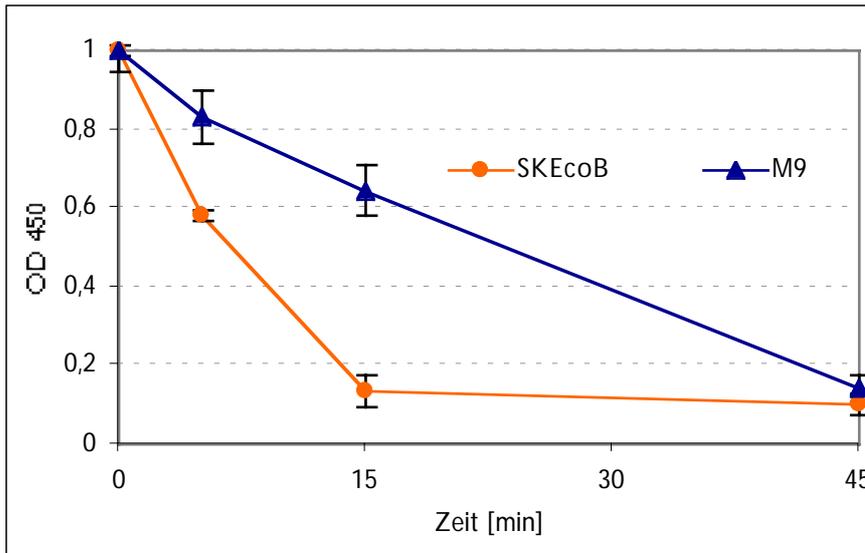


Abb. 41: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase I auf verschiedene Konstrukte in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. SKEcoB: 3 kb; M9: 290 bp. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven auf den Wert bei $t=0$ normiert und die Fehlerbalken entsprechend angeglichen. (Originalwerte: SKEcoB: 0,4; M9: 0,6)

Es wurden gespannte 3-kb-Konstrukte mit Topoisomerase I in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Topoisomerase-Inhibitors Camptothecin inkubiert (siehe Abb. 42). Man erkennt, daß in Abhängigkeit von der Dauer der Reaktion und der Konzentration des Enzyms mehrere Datenpunkte der Kurven mit und ohne Inhibitor sich nicht voneinander unterscheiden.

Die Relaxationswirkung von Topoisomerase I in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung, ursprünglich als Vorversuch für ein anderes Experiment geplant, ist in Abb. 43 gezeigt.

Die Hemmung von Topoisomerase I durch verschiedene Konzentrationen der Hemmstoffe Camptothecin und Ciprofloxacin wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 als „relative Aktivität“ aufgetragen. Dabei wird der ausgegebene Wert durch die Division des Z22-Signals zur Zeit t durch das Signal zu Anfang des Experiments ($t=0$) erhalten. Diese Ermittlung trägt möglichen Veränderungen des Signals, die nur durch die Wechselwirkung des Inhibitors mit der DNA, aber ohne Beteiligung der Topoisomerase auftreten, Rechnung.

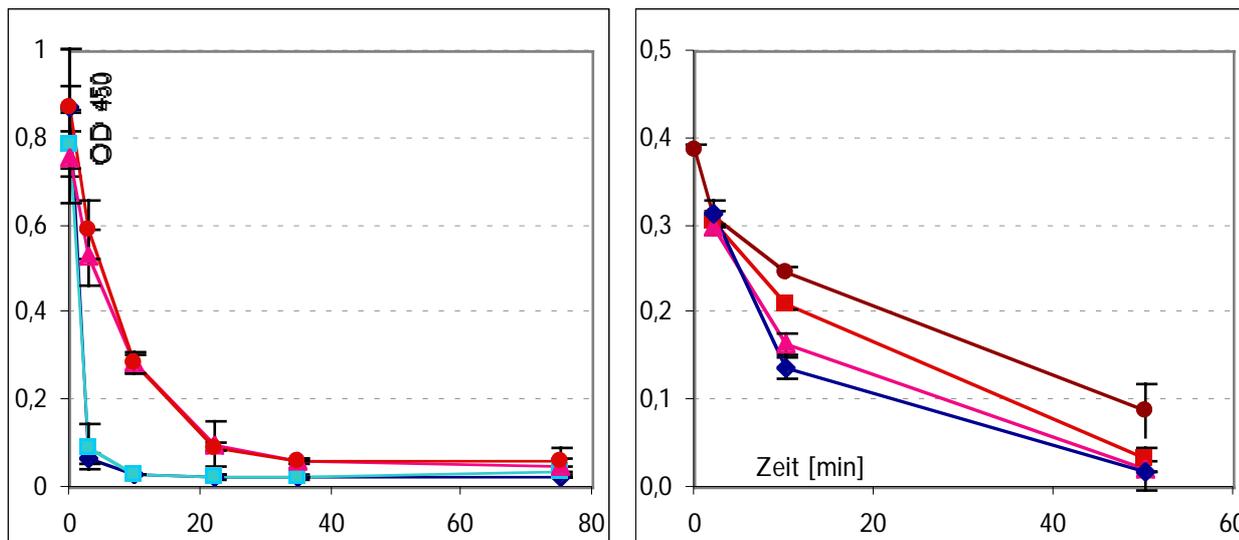


Abb. 42: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase I in Anwesenheit von Camptothecin (CCT) auf verschiedene Konstrukte in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. Alle Werte wurden mit dem mit 15 μM EtBr gespannten Konstrukt SKEcoB (3 kb) erhoben. Links: 7u TopoI/100 μl Ansatz, 0 μM ; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM CCT (von unten nach oben); rechts: 2 u TopoI/100 μl Ansatz, 0 μM ; 0,25 μM ; 2,5 μM ; 25 μM CCT (von unten nach oben); beide Reaktionen bei 0°C, gestoppt durch Zugabe von 100 μl 1 M NaCl und anschließender Waschung.

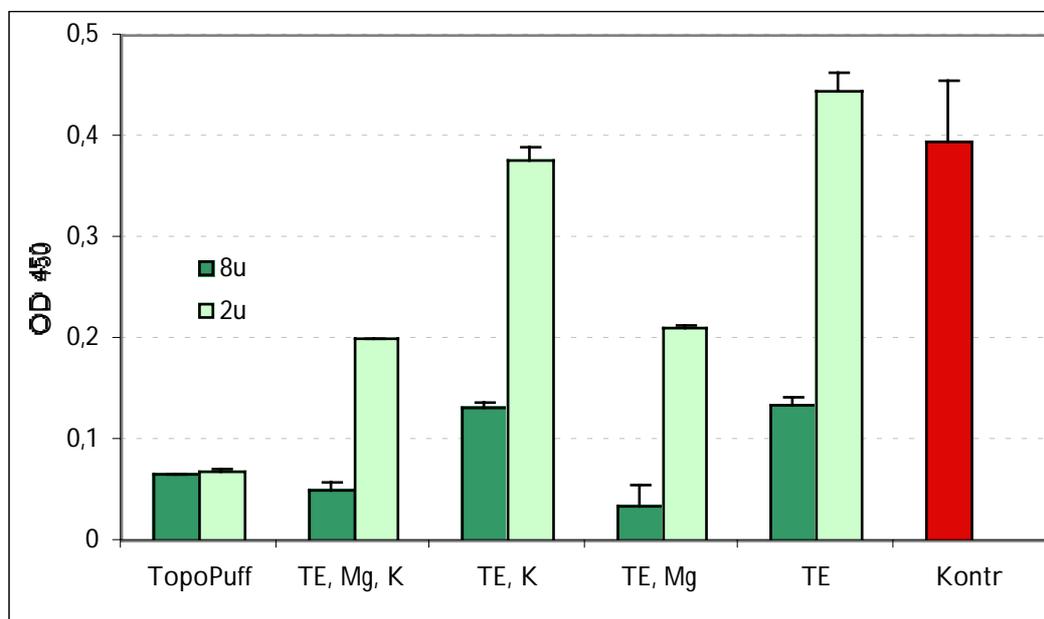


Abb. 43: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase I auf gespannte 3 kb-Konstrukte in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung. TE: Tris-Acetat pH 7,6; Mg: 15 mM Magnesium; K: 30 mM KCl; TopoPuff: Topoisomerase I-Puffer (Tris-Acetat pH 7,6; 15 mM Mg; 30 mM K; 5 mM DTT)

Abb. 45 zeigt das Z22-Signal gespannter 3-kb-Konstrukte in nach Inkubation mit Topoisomerase I und verschiedenen pharmakologisch aktiven Substanzen. Nur für Camptothecin wird eine Hemmung der Relaxationsaktivität klar erkennbar.

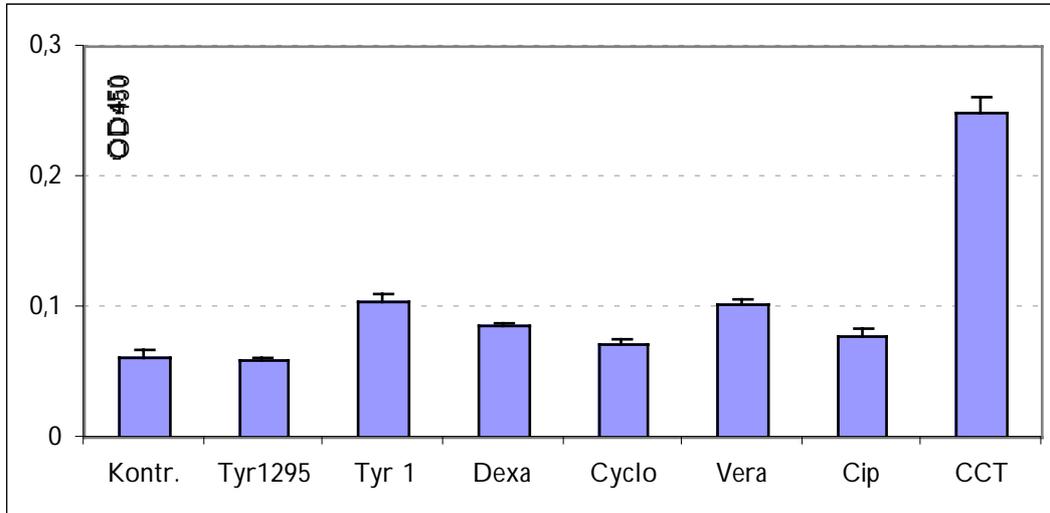


Abb. 45: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase I auf gespannte 3 kb-Konstrukte in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Inhibitoren. Alle Werte sind die absoluten OD450-Werte nach 60 min Reaktionszeit mit 2 u Topoisomerase I auf Eis. Kontr.: Kein Inhibitor; Tyr: Tyrphostin (Nr.); Dexa (methason); Cyclo(heximid); Vera(pamil); Cip(rofloxacine); CCT Camptothecin; alle 20µM.

DNA Topoisomerase-II aus Drosophila

Topoisomerase aus Drosophila ist der einzige kommerziell erhältliche Vertreter der Enzymklasse aus Eukaryonten. Das Enzym wurde analog der Topoisomerase I auf Wirkung auf gespannte DNA sowie die Kapazität, nachträglich Torsionsspannung in ungespannte DNA einzuführen (mechanistisch: durch Ethidiuminterkalation erzeugte positive Supercoils in Anwesenheit des Ethidiums zu relaxieren, siehe oben) untersucht. Abb. 46 zeigt das Ergebnis. Daneben ist die Wirkung einiger bekannter Inhibitoren der Topoisomerase II aus Eukaryonten (Etoposid) und Prokaryonten auf das Relaxationsverhalten des Enzyms aus Drosophila dargestellt.

DNA-Topoisomerase II aus micrococcus luteus (Gyrase)

Als Modellsystem für Topoisomerase II aus Prokaryonten wurde das Enzym aus Micrococcus luteus, welches kommerziell erhältlich ist (GibcoLife), verwendet. Abb. 47 zeigt das Ergebnis der nach dem bereits oben angewendeten Schema.

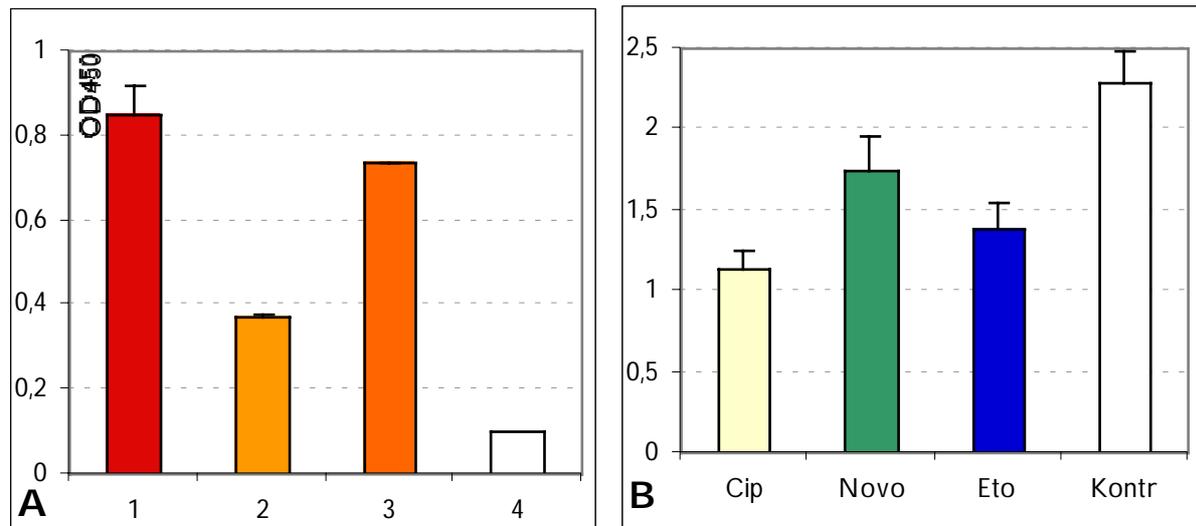


Abb. 46: A: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase II aus *Drosophila* auf gespannte 3 kb-Konstrukte. 1: mit 5 μM Ethidium gespannte DNA; 2 nach Einwirkung von TopoII; 3 Einwirkung wie unter 2 auf ungespannte DNA, 5 μM Ethidium im Puffer; 4 ungespannte DNA. B: Relative Hemmung der entspannenden Aktivität von TopoII in Anwesenheit von 25 μM Cip(rofloxacine); Novo(biocin); Eto(posid). Aufgetragen ist der Quotient aus dem Wert von $t = 0$ und $t = 45'$.

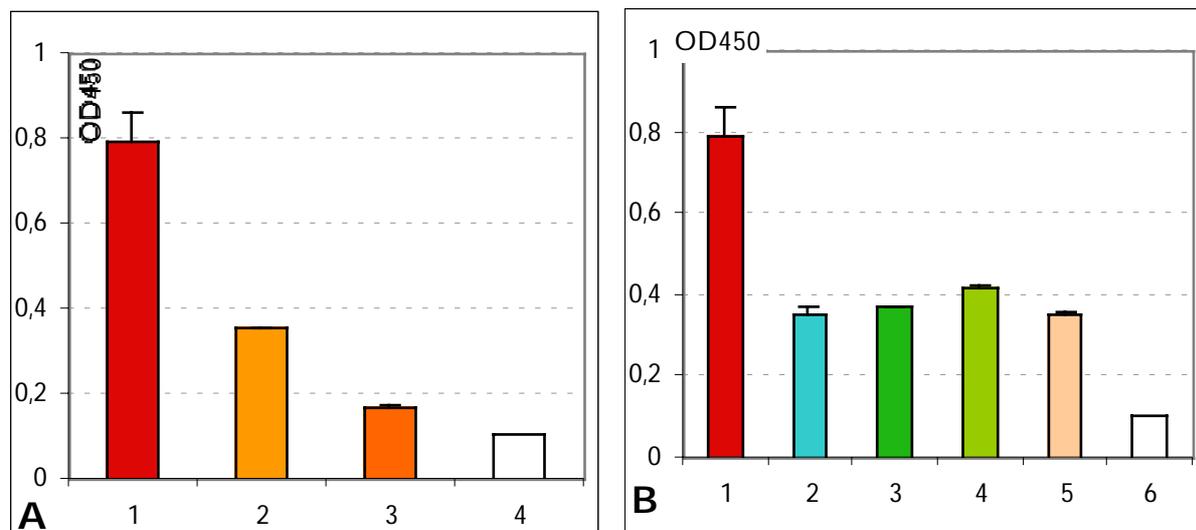


Abb. 47: A: Z22-Signal nach Wirkung von DNA Gyrase II aus *m. luteus* auf gespannte 3 kb-Konstrukte. 1: gespannte DNA; 2: gespannte DNA nach Einwirkung von Gyrase; 3 ungespannte DNA nach Einwirkung von Gyrase, Ethidium im Puffer; 4 ungespannte DNA. B: Hemmung der entspannenden Aktivität von Gyrase in Anwesenheit von je 25 μM Inhibitoren: 1 mit 5 μM Ethidium gespannte DNA; 2: ohne Inhibitor; 3: Etoposid; 4: Novobiocin; 5: Ciprofloxacin; 6: ungespannte DNA.

RNA-Polymerase-Aktivität

Die aus dem Plasmid Blueskript SKII hergestellten Konstrukte wiesen Promotorsequenzen für die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7 auf. In diesen Konstrukten lagen die Promotoren jeweils nahe und in Richtung auf die die Bindung vermittelnden Schleifen des Moleküls und unterschieden sich jeweils durch die Länge des zwischen der T3-Promotorsequenz insertierten Abschnitts; die Struktur ist in Abb. 48 gezeigt. Im Konstrukt SK-Z1 ist an einem Ende das erste putativ Z-bindende Alu-Fragment des humanen c-myc-Gens (Wölfl 1990) inseriert.

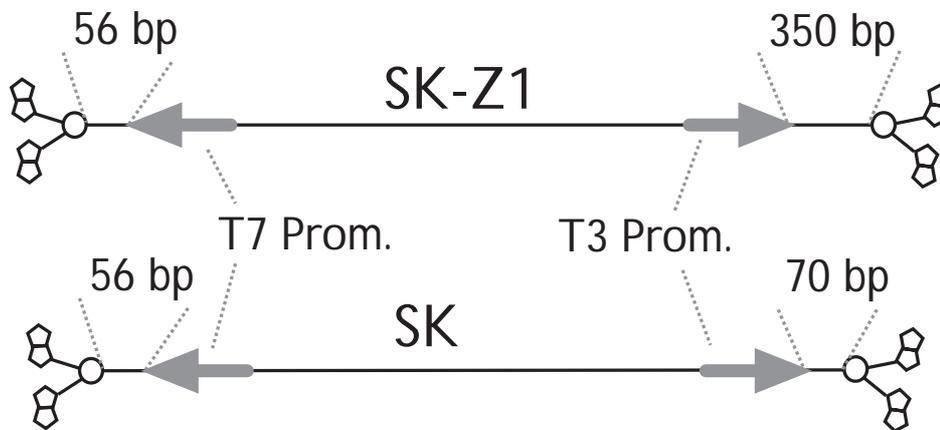


Abb. 48: schematische Darstellung der SK-Konstrukte mit Lage der T7-RNAPromotoren (links), und der T3-RNAPromotoren (rechts).

Die Konstrukte der SK-Serie wurden mit T7 und T3 RNA-Polymerasen in Reaktionspuffer inkubiert, als Kontrollen fungierten Ansätze ohne die für die Polymeraseaktivität notwendigen Ribonukleotide oder mit RNA-verdauenden Enzymen (RNAasen). Das gemessene Signal war die Bindung von Z22 an die behandelten Konstrukte. Die Ergebnisse sind in Abb. 49 gezeigt.

RNA-Polymeraseaktivität unterdrückt danach das Topologieabhängige Signal vollkommen; die Einwirkung von RNase H, aber nicht von RNase A hebt diesen Effekt wieder auf.

Die in Abb. 49 gezeigten Untersuchungen wurden an mit 20 μM Ethidium gespannter DNA vorgenommen. Es wurde DNA mit verschiedenen Vorspannungen auf die Unterdrückung des Z22-Signals durch Polymeraseaktivität untersucht. Hintergrund war die Annahme, daß möglicherweise ein genügend hohes Maß an Vorspannung nicht mehr unterdrückt werden könne. Abb. 50 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

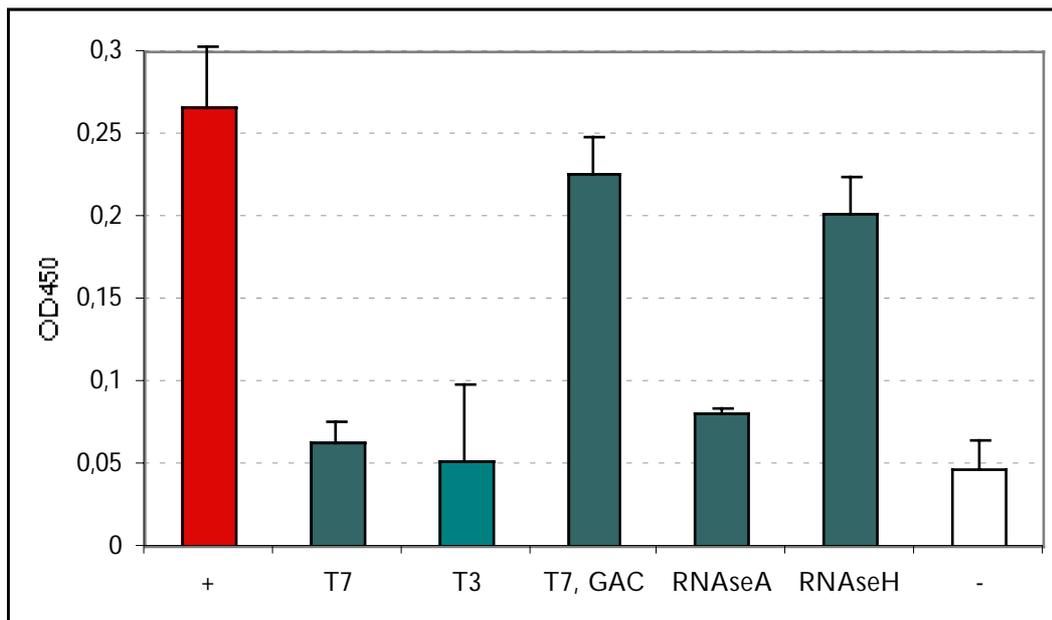


Abb. 49: A: Z22-Signal nach Wirkung von RNA-Polymerase auf mit 20 µM Ethidium gespannte 3 kb-SKZ1-Konstrukte. +: gespannte DNA; T7: Einwirkung von 1,1 u T7-RNA-Polymerase in Anwesenheit von je 1 mM ATP, CTP; GTP; UTP; T3: dito mit T3-RNA-Polymerase; T7 GAC: Reaktion von T7 in Abwesenheit von UTP; RNase A: Reaktion wie T7 in Anwesenheit von 10 u RNase A; Rnase H: Reaktion wie T7, dann Zugabe von 10 u RNase H; -: ungespannte DNA.

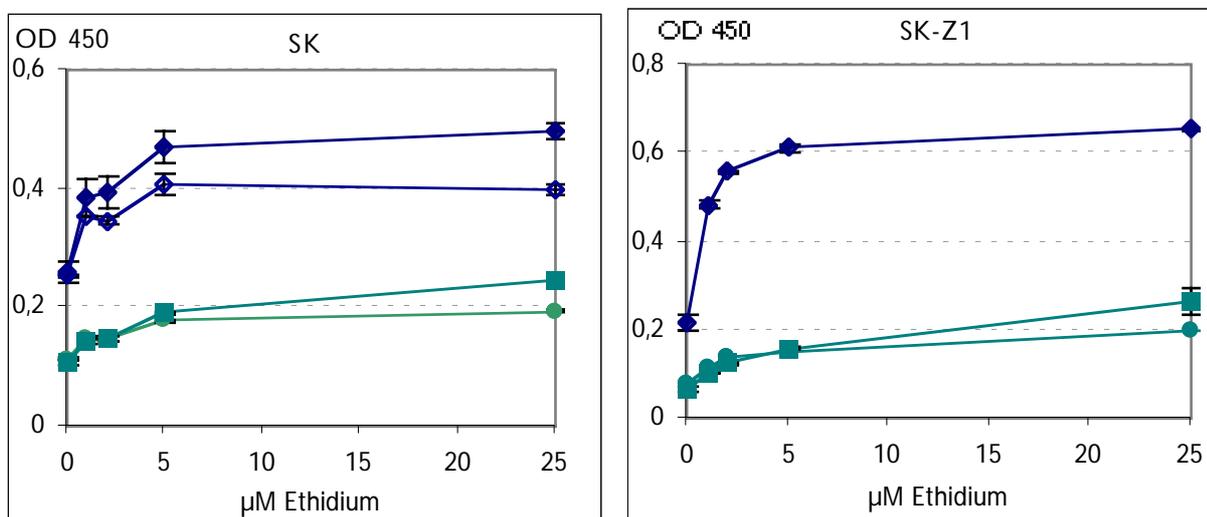


Abb. 50: Z22-Signal nach Wirkung von RNA-Polymerase auf mit verschiedenen Konzentrationen Ethidium gespannte 3 kb-Konstrukte. Volle Rauten: Konstrukt ohne Enzym; leere Rauten: Konstrukt mit T7-RNAP, dann RNase H; Quadrate: T7-RNAP; Kreise: T3-RNAP.