Material und Methoden

Materialien: Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, wurden von Sigma, Fluka oder Merck, Biochemika von Sigma, Enzyme von MBI oder LIFE, Oligodesoxynucleotide von TIB-Molbiol (Berlin), Radiochemikalien von NEN, Mikrotiterplatten von Boehringer Mannheim, Antikörper von Boehringer M., Sigma oder Dako bezogen. **Anti-DNA-Antikörper** wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt: Z22 von Tomislav Dorbic (AG Wittig), dem Labor von Dr Alex Rich (MIT, Cambridge, MA) sowie Burghardt Wittig selbst; 2C10, paZz, Z44 und anti-Histon-Antikörper von Dr D. Stollar (Tufts University, Boston, MA)),

PBS: phosphatgepufferte physiologische Salzlösung pH 7,2;

PBST: PBS + 0,05% (v:w) Tween 2000

Herstellung von Hantel-DNA

- Herstellung durch Restriktionsverdau: Plasmid Blueskript SK (Stratagene; 5 µg, präpariert aus dem E.coli Stamm XL-1Blue nach der Maxipräp-Methode von Qiagen) wurde mit EcoRI verdaut, die Reaktion durch Erhitzen auf 75°C gestoppt und mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde in Ligationspuffer aufgenommen und mit einem 200-fachen molaren Überschuss an ODN EcoBio in Anwesenheit von T4-DNA-Ligase bei 37°C ü.N. umgesetzt. Die Konzentration der Restriktionsfragment-Enden der Plasmid-(bzw. pcr-) DNA sollte dabei $10^{13} \mu\text{l}^{-1}$ nicht überschreiten. Das resultierende Produkt wurde über Qiagen PCR-Präparationssäulen nach Vorschrift des Herstellers von überschüssigem ODN-Dimer befreit oder durch PCR gereinigt. Die Konzentration des Produktes wurde densitometrisch aus einem Agarosegelbild bestimmt.
- Herstellung durch PCR: 50 µl Standard-PCR-Mix (je 2,5 mmol dNTP, je 5 µM linker und rechter Primer (pME-Ecor: GGCGGGAATTCCGAGCGCAGCGAGTC, pME-Ecol: GGCCGGAATTCGGCCCTTCGTCTTCAAG; 20 bp Primersequenz auf Templat, 6 bp Erkennungssequenz für Restriktionsendonuclease (EcoRI), 5 ng Templat (Plasmid pME), 0,8 µl Taq-Polymerase (MBI)), wurden mit folgendem Programm amplifiziert: 3' 94°C, 3 x (1' 92 °C; 45'' 55°C; 1' 72°C); 21 x (45'' 92 °C; 1' 72°C); 5' 60°C. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethanol gefällt, per Quia-Quick-Säulen (Qiagen) von Primern und Nukleotiden befreit und das Amplifikationsprodukt in EcoRI Reaktionspuffer aufgenommen und mit zehnfachem Überschuß Enzym 2 h verdaut. Ein Aliquot von 1 µl wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen und durch densitometrischen Vergleich mit den 2 kb- und

0,5 kb-Banden der Lambda-Phagen-DNA (HindIII-verdaut) ermittelt. Zum Einsetzen in die Ligationreaktion wurde mit Ethanol gefällt und in T4-DNA-Ligasepuffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung verlief analog dem oben beschriebenen Verfahren.

- Zur Kontrolle der Ligation wurden 10 ng Produkt 20' bei 37°C mit 2 u T4-DNA-Polymerase ohne dNTP inkubiert. Bei erfolgreicher Ligation sollte die Bande des Reaktionsansatzes auf dem Agarosegel im Vergleich zur Kontrolle nicht wesentlich geschwächt sein. Zur Kontrolle sollte bei jedem Versuch auch ein nichtligiertes Fragment sowie ein ligiertes Fragment in Anwesenheit eines Restriktionsenzym, welches auf der zu untersuchenden Sequenz eine Erkennungsstelle hat, mit analysiert wurden.

Bindung von DNA an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten

Biotinmodifizierte DNA wurde in einer Konzentration von 1-5 ng/100 µl in PBS auf einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte (Boehringer Mannheim, high capacity) 45 min bei RT inkubiert. Zur Erzeugung negativer Torsionsspannung wurde die DNA-Lösung vor der Bindung mit einer Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt (f.c. 0-50 µM EtBr). Anschließend wurde die Platte mindestens 3x mit PBST oder Wasser gewaschen.

ELISA:

Die gebundenen Primärantikörper wurden mit Sekundärantikörper-vermittelter Farbreaktion nachgewiesen. Da das erhaltene Signal nicht nur der Menge gebundenen Antikörpers, sondern auch der Konzentration und der Reaktionszeit des Farbreagenzes sowie der Umgebungstemperatur proportional ist, können ohne Standardisierung und Validierung der Reaktion nur unter identischen Bedingungen (nebeneinander) gewonnene absolute Werte miteinander verglichen werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden Doppelwerte aufgenommen. Die in den Graphiken angegebenen Fehlerbereiche beziehen sich jeweils auf die Differenz zwischen beiden Werten, bzw. zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert bei Mehrfachbestimmungen. Bei Bestimmung von >4 Werten ist die Standardabweichung angegeben.

Es ist dabei zu beachten, daß der angegebene Fehler sich nur auf die Abweichung zwischen zwei Messpunkten bezieht, die aus einem Experiment ermittelt wurden. Andere Abweichungen (durch Ungenauigkeiten der verwendeten Pipetten oder Waagen oder Temperaturschwankungen zwischen Reaktionsansätzen, die nebeneinander inkubiert wurden) sind dabei nicht berücksichtigt.

1. **Primärantikörper: Z22:** lyophilisierter monoklonaler Maus-anti-Z IgG (Subtyp 2b) Z22 wurde in Wasser ad f.c. 1,4 mg/ml gelöst. Zur Bestimmung von Z-DNA wurden 100 µl einer 1:2000 mit PBST verdünnten Lösung 60 min bei RT auf dem DNA-beschichteten Mikrotiterplattennapf inkubiert und anschließend mit PBST reichlich gewaschen.
paZz: Lyophilisierter polyklonaler Ziege-anti(Br-CpG)_n-Antikörper wurde in Wasser ad 5 mg/ml gelöst. Zur Bestimmung von Z-DNA wurden 100 µl einer 1:5000 mit PBST verdünnten Lösung 60 min bei RT auf dem DNA-beschichteten Mikrotiterplattennapf inkubiert und anschließend mit PBST reichlich gewaschen.
2C10: lyophilisierter monoklonaler Maus-anti-B IgG 2C10 (Subtyp 2b), (2,8 mg/ml; beschrieben in Stollar et al.). Zur Bestimmung von B-DNA wurden 100 µl einer 1:10000 mit PBST verdünnten Lösung 60 min bei RT auf dem DNA-beschichteten Mikrotiterplattennapf inkubiert und anschließend mit PBST reichlich gewaschen.
Z-α: in Wasser gelöstes rekombinantes Z-α-GST-Fusionsprotein (Konz: 3 mg/ml; Dank an Dr. Jens Alken, Berlin/ Boston) wurde in PBST 1:1000 verdünnt, 60 min bei RT inkubiert und anschließend mit PBST reichlich gewaschen.
2. **Sekundärantikörper:** Zur Bestimmung von Z22 und 2C10 wurde anti-Maus-IgG Fab, Peroxidase-konjugiert (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Zur Bestimmung von gebundenem Primärantikörper wurden 100 µl einer 1:10.000 mit PBST verdünnten Lösung 60 min bei RT inkubiert und anschliessend mit PBST reichlich gewaschen.
Zur Bestimmung von gAZ wurde anti-Ziege-IgG Fab, Peroxidase-konjugiert (Sigma) eingesetzt. Zur Bestimmung von gebundenem Primärantikörper wurden 100 µl einer 1:10000 mit PBST verdünnten Lösung bei 90 min bei RT inkubiert und anschliessend mit PBST reichlich gewaschen.
Zur Bestimmung von Z-α-GST-Fusionsprotein wurde aus Kanninchen gewonnener Antikörper (Dank an Dr. Jens Alken, Berlin/ Boston) in einer Verdünnung von 1:10 000 60 min bei RT inkubiert und dieser im dritten Schritt mit anti-Rabbit-POD Sekundärantikörper nachgewiesen.
3. **Peroxidase-Farbreaktion:** Substratlösung: 1 mg Tetramethylbenzidin in 100 µl DMSO gelöst, und 4 µl 30%iger H₂O₂ (f.c. 0,012%) wurden zu 10 ml Natriumacetatlösung (100 mM, pH 6,0) zugegeben. 100 µl dieser Substratlösung wurden in jeden Mikrotiterplattennapf gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Gebundene Peroxidase führt zu einer türkisblauen Farbreaktion. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl 1 N H₂SO₄ zugegeben. Die nach gelb umschlagende Farbe wurde im ELISA-Photometer (Molecular Devices) bei 450 nm (Abgleich bei 650 nm) gemessen. Die erhaltenen Werte wurden in Excel (Microsoft) übernommen und ausgewertet.

Etablierung von ELISA-Methoden:

Zur Prüfung, ob Antikörper:Ligand-Wechselwirkung mit den zur Verfügung stehenden Proben durch ELISA nachweisbar waren, wurde das System vom Sekundärantikörper aufwärts auf Bindung geprüft. Typischerweise wurde die Konzentration der Proteine oder Antikörper, soweit nicht bekannt, durch BCA-Assay (Pierce) ermittelt. Jeweils 50 µl Proteinlösung in PBS mehrerer Verdünnungen wurde auf Maxisorb-ELISA-Platten (Nunc) 90 min bei RT inkubiert und anschliessend mit PBS gewaschen. Die Platten wurden mit 3%iger BSA-Lösung in PBS 30 min bei RT inkubiert und anschliessend mit PBST gewaschen. Dann wurden die Platten 90 min bei RT mit verschiedenen Konzentrationen des Sekundärantikörpers (je 100 µl in PBST) inkubiert und anschliessend mit PBST gewaschen. Es wurde 20 min mit Substratlösung inkubiert, 100 µl H₂SO₄ zugegeben und im ELISA-Photometer bei 450 nm (Abgleich bei 650 nm) gemessen. Es wurde jeweils die Sekundärantikörperkonzentration als Arbeitskonzentration verwendet, die am deutlichsten zwischen verschiedenen Antigenkonzentrationen diskriminierte (max OD_{450_{verd1}} / OD_{450_{verd2}}) und dabei nach 20-minütiger Inkubation mit Substrat einen OD-Wert $\geq 0,5$ lieferte. Iterativ wurde dann die gleiche Routine mit dem nächsten Protein durchgeführt.

Enzymreaktionen an matrixfixierter DNA

Wenn nicht anders im Text oder den Bildunterschriften angegeben, wurden alle Reaktionen in 100 µl Reaktionspuffer des jeweiligen Enzyms durchgeführt.

- **Restriktionsverdau:** 10 u Enzym wurden 20 min bei 37°C verdaut. Kontrollen ohne Enzym wurden ebenfalls im Reaktionspuffer inkubiert.
- **T7-RNA-Polymerase:** Wenn nicht anders geschildert, wurden 10 u Enzym in 100 µl Reaktionspuffer 10 min bei 37°C verdaut. Kontrollen ohne Enzym wurden ebenfalls im Reaktionspuffer inkubiert.
- **RNAase H, RNAase A:** Das Enzym wurde in 100 µl RNA-Polymerasepuffer ohne NTP 10 min bei RT inkubiert.
- **Topoisomerase I:** 2 u Enzym wurden in 100 µl Reaktionspuffer bei 0°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 Vol 1 M NaCl-Lösung gestoppt. Zur Hemmung der Enzymaktivität wurde ggf. Etoposid zugegeben (aus: Vepesid J (Bristol, München); enthält 20 mg/ml Etoposid 30 mg/ml Benzylalkohol; 650 mg/ml Macrogol 300)

Herstellung der Konstrukte

Alle Klonierungsarbeiten wurden gemäß veröffentlichten Protokollen (Sambrook et al.) durchgeführt.

Experimentelle Details zu einzelnen Abbildungen:

Abb. 14: Validierung der Ligationskontrolle mit ODN: 30 µg ODN B2B wurde in 60 µl Puffer mit T4-Polynukleotidkinase 1 h bei 37°C in Anwesenheit von 1 mM ATP phosphoryliert. Der Ansatz wurde in vier Teile geteilt und diese wurden wie folgt weiterbehandelt: 1) Zugabe von 10 µl Puffer; 2) Zugabe von 10 u T-4-DNA-Ligase in 10 µl Reaktionspuffer, Inkubation für 30 min bei RT; 3) Zugabe von 8 µg vorher phosphoryliertem ODN BamT7-14 sowie anschließend Zugabe von Ligase und Reaktion wie unter 2); 4) Zugabe von 8 µg vorher nicht phosphoryliertem ODN BamT7-14 sowie anschließend Zugabe von Ligase und Reaktion wie unter 2). Alle Ansätze wurden mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, in 10 µl Wasser aufgenommen und geteilt. Je eine Hälfte des Ansatzes wurde in 1 u T-4-DNA-Polymerase in Reaktionspuffer ad 20 µl aufgenommen und 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde mit 5 µl Stopplösung (EDTA/SDS) 5 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis gestellt; die andere Hälfte wurde als Kontrolle in Puffer ohne Enzym aufgenommen und gleich behandelt. Ein Zehntel der Ansätze wurden für den Nachweis der Bindung von Z22 abgenommen (s.u.); der Rest wurde mit 20 µl Formamid (1% Bromphenolblau) aufgenommen und 20 ml der entstehenden Mischung auf einem 15% Polyacrylamidgel 60 min bei 120 V getrennt. Das Gel wurde in Methylenblau gefärbt, in Wasser entfernt und mit einer Videokamera photographiert.

Abb. 15: Kontrolle der biotinylierten Kontrukte mit T7-DNA-Polymerase: 60 ng Konstrukt SKZ1-Eco wurde in 60 µl Reaktionspuffer für T-4-DNA-Polymerase aufgenommen und in zwei Teile á 20 µl und 40 µl geteilt; in den Ansatz zu 40 µl wurde 1 u T4-DNA-Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde in gleich große Volumina geteilt und in einen der Teilansätze 10 u EcoRI gegeben, anschließend wurden alle Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert, mit 5 µl Stopplösung (EDTA/SDS) 5 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Alle Ansätze wurden mit 4 µl Ficoll/Bromphenolblau versetzt, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und 30 min bei 120 V der Elektrophorese unterworfen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Abb. 16: Nachweis von DNA mit B-DNA-spezifischem Antikörper 2C10: Das ODN SacI-B sowie das 3 kb Konstrukt SK-Z1B aus dem Plasmid SK-Z1 (BamHI verdaut) und dem ODN B2B wurden auf 1µg/ml in PBS verdünnt und je 2 µl sowie ein Vielfaches davon wurde in PBS ad 200 µl aufgenommen; diese Lösung wurde auf Streptavidin-gebundenen Mikrotiterplatten 45 min inkubiert und wie oben angegeben weiterbehandelt.

Abb. 17: Linearer Zusammenhang zwischen Antikörpersignal und DNA-Menge: Das Konstrukt aus dem Plasmid SKZ1 und dem ODN EcoBio wurde wie oben angegeben an der Platte gebunden und mit jeweils 10 u der in der Graphik angegebenen Restriktionsenzyme

in 100 µl Reaktionspuffer 60 min bei 37°C auf der Mikrotiterplatte verdaut und wie oben angegeben mit Antikörper 2C10 weiterbehandelt.

Abb. 18: Störung der B-DNA-Form durch Interkalation von Ethidium. Je 10 ng des 3 kb Konstruktes SK-Z1B (s.o.) pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde in Abwesenheit von Ethidiumbromid gebunden. Nach Abwaschen nichtgebundener DNA wurde der Antikörper 2C10 in der üblicherweise verwendeten Konzentration in PBST inkubiert, wobei der Antikörperlösung vor der Inkubation mit der auf der Platte gebundenen DNA Ethidiumbromid in den in der Graphik angegebenen Konzentrationen zugefügt worden war. Nach 60 min Inkubation wurde mit ethidiumfreiem PBST gewaschen und wie angegeben mit Sekundärantikörper weiterbehandelt.

Abb. 19: Antikörperbindung an matrixfixierte gespannte bzw. ungespannte DNA: Es wurde das Plasmid SK-Z1 mit BamHI verdaut und wie folgt weiterbehandelt: 1) Es wurde mit am 5'-OH phosphoryliertem (siehe oben Abb. 14) ODN B2B ein Hantelkonstrukt wie angegeben hergestellt; 2) es wurde mit nicht am 5'-OH phosphoryliertem ODN B2B ein Hantelkonstrukt hergestellt; 3) es wurde das verdaute Plasmid 60 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase umgesetzt, gefällt und dann mit am 5'-OH phosphoryliertem ODN B2B ein Hantelkonstrukt hergestellt. Jeweils 10 ~g der Konstrukte wurden pro Plattenvertiefung in Puffer gebunden. Im Falle der "gespannten" Proben enthielt der Puffer 20 µM EtBr während der Bindung der DNA an die Platte. Die gebundene DNA wurde wie angegeben mit Z22 oder 2C10 und dann mit Sekundärantikörper weiterbehandelt.

Abb. 20: Antikörperbindung an matrixfixierte, gespannte DNA: Neben dem in Abb. 19 beschriebenen Konstrukt Nr. 1 wurde analog ein Konstrukt mit dem ODN B1B hergestellt und analog eingesetzt.

Abb. 21: Bindung des mAb Z22 an DNA nach Verdau mit Restriktionsenzymen: je 20 ng SK-Z1B- wurden in 100 µl Reaktionspuffer mit je 10 u EcoRI oder XbaI 30 min bei 37°C umgesetzt und in Anwesenheit von 20µM Ethidium an die Streptavidin-gebundene Mikrotiterplatte gebunden.

Abb. 22: Abhängigkeit von Antikörperbindung und Vorspannung. Es wurden Konstrukte aus Plasmid SK-Z1 und ODN B2B verwendet. Die Bindung erfolgte in PBS mit der in der Graphik angegebenen Konzentration von Ethidiumbromid.

Abb. 23: Abhängigkeit des Signals von der Bindungszeit der DNA. Es wurden Konstrukte aus Plasmid SK-Z1 und ODN B2B verwendet. Die Bindung erfolgte in PBS in Abwesenheit von Ethidiumbromid.

Abb. 24: Exonukleaseverdau der Hantelkonstrukte: je 40 ng SK-Z1B wurden in 40 µl Reaktionspuffer mit je 1 u T4-DNA-Polymerase für die angegebene Zeit bei 37°C umgesetzt. Der gesamte Ansatz wurde mit PBS auf 200 µl Gesamtvolumen ergänzt und mit 4 µl 1 mM

Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von 20µM Ethidium gebracht. Je 50 µl dieser Lösung wurden auf die Streptavidin-gebundene Mikrotiterplatte gebracht und mit Z22 sowie 2C10 wie angegeben weiterbehandelt.

Abb. 25: Endonukleaseverdau in situ: je 20 ng SK-Z1B wurden in Anwesenheit von 20µM Ethidium an die Streptavidin-gebundene Mikrotiterplatte gebunden und nach Waschung mit je 10 µl EcoRI oder XbaI in 100 µl Reaktionspuffer 30 min bei 37°C umgesetzt und mit Z22 sowie 2C10 wie angegeben weiterbehandelt.

Abb. 26: Stabilität der topologischen Fixierung in Lösung: je 10 ng SK-Z1B wurden in 50 µl PBS (20 µM EtBr) auf der Streptavidin-gebundenen Mikrotiterplatte mindestens 60 min inkubiert. Danach wurde aus jeweils sechs Nöpfchen der Überstand abgezogen, drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen und je zwei Nöpfchen bei RT wie folgt behandelt: 1) es wurde mit PBS inkubiert; 2) es wurde mit 1 mM Biotin enthaltendem PBS inkubiert; 3) es wurde mit 1 mM Biotin enthaltendem PBS gespült, dann mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS inkubiert. Dieses Vorgehen wurde zu verschiedenen Zeiten auf je sechs Nöpfchen angewandt und alle Proben wurden dann gemeinsam mit Z22 inkubiert und wie angegeben weiterbehandelt.

Abb. 27: Temperaturstabilität der Torsionsspannung: je 10 ng SK-Z1B wurden in 50 µl PBS (20 µM EtBr) auf der Streptavidin-gebundenen Mikrotiterplatte mindestens 60 min inkubiert. Danach wurde aus jeweils einem Streifen, enthaltend acht Nöpfchen, der Überstand abgezogen, drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen und bei 50°C mit 100 µl PBS inkubiert. Dieses Vorgehen wurde zu verschiedenen Zeiten auf je einen Streifen Nöpfchen angewandt und wer als erster diese Stelle tatsächlich liest und dem Autor anzeigt, bekommt eine Flasche Jaloco Reserva 1993 alle Proben wurden dann gemeinsam mit Z22 oder 2C10 inkubiert und wie angegeben weiterbehandelt.

Abb. 28: Stabilität des topologisch ungespannten Zustands bei Inkubation mit Ethidium: je 10 ng SK-Z1B wurden in 50 µl PBS (mit oder ohne 20 µM EtBr) auf der Streptavidin-gebundenen Mikrotiterplatte mindestens 60 min inkubiert. Danach wurde aus je zwei Ethidium enthaltenden und zwei kein Ethidium enthaltenden Nöpfchen der Überstand abgezogen, drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Diese Nöpfchen wurden bei RT wie folgt behandelt: 1) die vorher Ethidium enthaltenden Nöpfchen wurden mit PBS inkubiert; 2) die vorher kein Ethidium enthaltenden Nöpfchen wurden mit PBS (20 µM EtBr) inkubiert. Dieses Vorgehen wurde zu verschiedenen Zeiten angewandt und alle Proben wurden dann gemeinsam mit Z22 inkubiert und wie angegeben weiterbehandelt.

Abb. 29: Bindung des Antikörpers Z22 an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel: 1 µl Streptavidin-beschichtete Magnetpartikelsuspension (Dynabeads, Dynal, Oslo), wurden in

90 µl Wasser aufgenommen, durch magnetisch induzierte Sedimentation und anschließendes Aufnehmen im gleichen Volumen Wasser gewaschen und in 6 Portionen á 30 µl geteilt. Es wurden jeweils dazugegeben: 1) 30 ng SK-Z1B in PBS; 2) 30 ng SK-Z1B in PBS, 5 µM Ethidium; 3) ohne DNA. Die Suspension wurde 30 min bei RT stehen gelassen, dann die Partikel magnetisch suspendiert und drei Mal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde durch Inkubation der Mikropartikel mit Z22, Sekundärantikörper, TMB-Substratlösung und photometrischer Messung analog dem ELISA-Verfahren verfahren. Die Werte wurden nur einfach bestimmt.

Abb. 30/31: Bindung der Antikörper Z22 und 2C10 an biotinylierte ODN: es wurden jeweils 10 ng der entsprechenden ODN pro Mikrotiterplattennapf in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden und mit Antikörper nachgewiesen.

Abb. 32: Bindung in Abhängigkeit der ODN-Modifikation am 5'-OH: von den in Abb. 14 gezeigten ODN wurden jeweils 10 ng der entsprechenden ODN pro Mikrotiterplattennapf in PBS gebunden und mit Antikörper nachgewiesen.

Abb. 33: Bindung von Z22 ODN sk796-Bio: 5'-biotinyliertes ODN sk-796Bio wurde in den angegebenen Mengen pro 100 µl in PBS aufgenommen und an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Für einige Proben (siehe Abb.) wurde nach 45 min Inkubation ein zweiter Inkubationsschritt für 5 min mit 1 mM Biotin in PBS vorgenommen.

Abb. 34: Bindung von polyklonalem Z-DNA-spezifischem Antikörper : jeweils 10 ng 3 kb-Konstrukt Sk-Z1E wurden in Anwesenheit von 10 µM Ethidiumbromid in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Die Proben wurden wie folgt weiterbehandelt: 1) Inkubation mit 10 U Topoisomerase I in Reaktionspuffer; 2) Inkubation mit 10 U EcoRI in Reaktionspuffer; 3) Inkubation in PBS; 4) ungespannte DNA (gleiche Menge DNA ohne Ethidium). Nach Inkubation für 30 min bei RT wurde mit PBS gewaschen und wie oben angegeben mit polyklonalem Antikörper weiterbehandelt.

Abb. 35: Bindung von Z22 an 3 kb-Konstrukte pME-BamBio: jeweils 10 ng der nach der beschriebenen Standardmethode durch Verdau mit BamHI und Ligation mit ODN B2B hergestellten Konstrukte wurden mit variierenden Konzentrationen Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wurde Z22 nach der oben angegebenen Methode gebunden und nachgewiesen.

Abb. 36/37/38: Bindung von Z22, paZz sowie der Z α Domäne aus dsRAD1 an kurze Konstrukte: es wurden mit den im Sequenzanhang angegebenen Primern die das Insert der pME-Plasmidfamilie (s. Pulleyblank) flankierenden 280bp amplifiziert und aus den daraus gewonnenen Amplifikaten durch Verdau mit EcoRI und Ligation nach der oben angegebenen Vorschrift

biotinylierte Hantelkonstrukte hergestellt. Jeweils 10 ng der Konstrukte wurden mit variierenden Konzentrationen Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wurden die angegebenen Antikörper bzw. Proteine nach den oben angegebenen Standardmethoden gebunden und nachgewiesen.

Abb. 39: Konkurrenz von Z22 und paZz: je 10 ng 3 kb-Konstrukte SK-EcoBio wurden mit 10 μ M Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Die Primärantikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen in PBST gemischt und wie angegeben gebunden und mit Sekundärantikörper nachgewiesen.

Abb. 40: Wirkung von DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus auf matrixfixierte DNA: je 10 ng 3 kb-Konstrukte SK-Z1B wurden mit 15 μ M Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Die Proben wurden wie folgt weiterbehandelt: 1) Inkubation in Topoisomerasepuffer; 2) Inkubation mit 2 u Topoisomerase I in Reaktionspuffer für 45 min bei RT; 3) Inkubation ungespannter DNA mit 2 u Topoisomerase I in Reaktionspuffer mit 15 μ M für 45 min bei RT; 4) ungespannte DNA.

Abb. 41: Z22-Signal nach Wirkung von DNA-Topoisomerase I in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit: je 10 ng 3 kb-Konstrukte SK-Z1B bzw. 290 bp-Konstrukte M9 wurden mit 15 μ M Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Die Proben wurden mit 2 u Topoisomerase I pro 100 μ l Reaktionspuffer bei 0°C umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. 1 M NaCl gestoppt. Nach Waschen mit PBST und Inkubation auf Eis wurden alle Proben gemeinsam mit Z22 wie beschrieben behandelt.

Abb. 42/44/45/46: Wirkung von DNA-Topoisomerasen in Anwesenheit von Inhibitoren: je 10 ng 3 kb-Konstrukte SK-Z1E wurden mit 15 μ M Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Es wurden Stammlösungen der angegebenen Topoisomeraseaktivität mit Reaktionspuffer hergestellt und mit Stammlösungen (gewöhnlich 1 mM) der angegebenen Inhibitoren versetzt. Die Inhibitoren wurden gewöhnlich ad 10 mg/ml in DMSO gelöst und durch Pipettieren dieser Lösung in Wasser verdünnt. Die Reaktion mit Topoisomerase I erfolgte auf Eis, mit Topoisomerase II bzw. Gyrase bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. 1 M NaCl gestoppt. Nach Waschen mit PBST und Inkubation auf Eis wurden alle Proben gemeinsam mit Z22 wie beschrieben behandelt.

Abb. 49/50: A: Z22-Signal nach Wirkung von RNA-Polymerase: je 10 ng 3 kb-Konstrukte SK-Z1B wurden mit 20 μ M Ethidium inkubiert und in PBS an die Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte gebunden. Die Reaktionen unter den in der Abb. angegebenen

Bedingungen fanden für 15 min bei 37°C statt. Es wurde mit PBS gespült, anschließend wurde entweder mit PBS oder mit den angegebenen RNAasen in Reaktionspuffer inkubiert. Nach Waschen mit PBST wurden alle Proben gemeinsam mit Z22 wie beschrieben behandelt.