

3 Methoden

3.1 DNA-Techniken

3.1.1 Allgemeines

Molekularbiologische Standardtechniken wie Pufferherstellung, Phenolextraktion und DNA-Fällung (mit Ethanol und Isopropanol), wurden wie beschrieben durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Chemisch kompetente Zellen wurden durch die Behandlung mit CaCl_2 hergestellt (Mandel & Higa, 1970).

3.1.2 DNA-Isolierung

Die Gewinnung von Plasmid- und Phagen-RF-DNA aus Bakterienzellen erfolgte durch Kochen mit Triton/Sucrose-Puffer (Holmes & Quigley, 1981). Der QIAprep *Spin Miniprep Kit* wurde angewendet, wenn die DNA anschließend sequenziert werden sollte. Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab (0,5 - 1 mg) mit dem QIAgen *Plasmid Maxi Kit* aus 200 ml Zellkultur (stationäre Phase) isoliert. Einzelsträngige M13-DNA (und deren Derivate) wurde aus Phagen durch PEG 6.000-Fällung erhalten (Messing, 1983). DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen bzw. aus Polyacrylamidgelen mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* gewonnen.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente für die *in vitro*-Rekombination herzustellen, wurde in einigen Fällen PCR zur Amplifizierung des gewünschten Fragmentes angewandt (Mullis & Faloona, 1987; Innis *et al.*, 1988). Dazu wurde die thermostabile Deep-Vent[®] DNA-Polymerase eingesetzt. Ein 100 μl -Reaktionsansatz enthielt üblicherweise 0,05 bis 0,1 μg *template*-DNA, 20 - 50 pmol je *primer*, 0,2 mM je dNTP und 2 Einheiten Polymerase.

Tab. 6 Temperaturprogramm der PCR

Teilschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	1	95	1 ^{a)}
Denaturierung	1	95	} 30-35 ^{d)}
Hybridisierungs	1	X ^{b)}	
Primerelongation	Y ^{c)}	75	
Primerelongation	10	75	1

a) vor Zugabe der Polymerase

b) Die Temperatur wurde der Schmelztemperatur des verwendeten *primers* angepaßt

c) 1 min/1 kb *template*

d) Die Zahl der Zyklen wurde dem gewünschten Produkt angepaßt

Die Reaktionsprodukte wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und zur Ligation eingesetzt.

3.1.4 *In vitro* Rekombinationstechniken

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erzeugt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls gereinigt (*QIAEX II*, 3.1.2).

Die Umwandlung kohäsiver Enden in glatte Enden erfolgte durch Behandlung des DNA-Fragmentes mit T4-DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in einem 20 µl-Ansatz mit 2,5 Einheiten Polymerase je 1 - 5 pmol kohäsiver Enden für 30 min bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert (10 min, 75°C). Die DNA wurde nach Ethanolfällung in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

Um Rezirkularisierung von linearisiertem Vektor zu verhindern, wurde die DNA mit *shrimp* alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt. 10 pmol 5'-Enden wurden mit 1,5 Einheiten SAP für 60 min bei 37°C in SAP-Puffer dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C für 20 min inaktiviert. Die so erhaltene DNA wurde direkt für die Ligation eingesetzt.

Zur Ligation von Oligonukleotiden mit *HindIII-BamHI* präpariertem pBR329-Vektorfragment wurden Oligonukleotide (Tab. 3) hybridisiert und ligiert. Die ds-DNA aus

Oligonukleotiden wurden dabei in einem 50-fachen molaren Überschuß, bezogen auf die Menge an DNA-Fragment, eingesetzt, die Ligation erfolgte wie unten beschrieben.

T4-DNA-Ligase wurde zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektor eingesetzt. Der 20 µl-Ansatz enthielt T4-Ligasepuffer, 0,5 - 1,0 pmol Fragment-DNA, 0,1 - 0,2 pmol Vektor-DNA und 400 Einheiten T4-DNA-Ligase. Der Reaktionsansatz wurde bei 16°C über Nacht (ca. 16 h) inkubiert und danach direkt zur Transformation (3.1.1) von Bakterienzellen eingesetzt.

3.1.5 *telN* Mutagenese

3.1.5.1 Deletionen am 5'- und 3'-Ende des Gens

Verkürzte *telN* Gene wurden mittels PCR hergestellt. Die *primer* (Tab. 3) wurden so konstruiert, daß vor der ersten Aminosäure der verkürzten Gene *in frame* eine *NdeI* Schnittstelle entstand. Die *NdeI*-Schnittstelle liefert das Startcodon für das verkürzte Gen. Der *primer* am 3'-Ende des Gens enthielt *in frame* ein TAA-Stopcodon sowie eine *HindIII* Schnittstelle. Als *template* diente pJD102 (Tab. 2). Der Vektor pMS470Δ8 (Tab. 2) und die aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente wurde mit *NdeI* und *HindIII* verdaut. Die Ligation des 4 kb Fragmentes von pMS470Δ8 mit dem so behandelten PCR-Fragment ergab pJD102Δ1-pJD102Δ14 (Tab. 2). Der verwendete Vektor pMS470Δ8 enthält vor der *NdeI*-Schnittstelle die Shine-Dalgarno-Sequenz von *Gen10* des Bakteriophagen T7 und noch weiter *upstream* den *tac* Promotor aus *E. coli*. Dadurch wird die gezielte Überexprimierung der verkürzten *telN* Gene ermöglicht.

3.1.5.2 Punktmutationen

Punktmutationen in *telN* wurden durch sequenzspezifische Mutagenese erzeugt (Weiner *et al.*, 1994). Dabei wurde das Plasmid pJD101 als *template* für die Mutagenese-PCR benutzt. Die eingesetzten, komplementären *primer* (Tab. 3) enthielten dabei die gewünschte Mutation. *Pfu* Polymerase wurde eingesetzt, um ein vollständiges Plasmid mit der gewünschten Mutation herzustellen. Die methylierte *template*-DNA konnte durch Zugabe von *DpnI* - einem Enzym, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA erkennt - verdaut werden. Das neu synthetisierte Plasmid mit der gewünschten Mutation blieb erhalten und wurde direkt zur Transformation eingesetzt. Die so gewonnenen Mutationen in pJD101 sind wie folgt bezeichnet (Tab. 2): pJD101 XposY. Dabei bezeichnet X die ursprüngliche Aminosäure, welche durch die Aminosäure Y ersetzt wurde.

3.1.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurde überprüft.

Die DNA wurde von der Serviceabteilung des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert.

3.1.7 DNA Endmarkierung

3.1.7.1 5'-Enden

Zur radioaktiven Markierung von ss- und ds-DNA 5'-Enden wurde dephosphorylierte DNA eingesetzt (siehe 3.1.4). In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 1-10 pmol 5'-Enden mit 10 Einheiten T4-Polynukleotidkinase und 60 µCi (20 pmol) [γ -³²P] ATP in T4-PNK-Puffer bei 37°C für 45 min behandelt. Die anschließende Inkubation bei 65°C für 35 min diente zur Inaktivierung des Enzyms.

3.1.7.2 3'-Enden

Zur radioaktiven Markierung von ds-DNA 3'-Enden wurden 0.5-1 pmol 3'-Enden mit 60 Einheiten Kalbs-Thymus terminale Transferase, 60 µCi (20 pmol) [α -³²P] dATP und 2,5 mM CoCl₂ in terminale Transferase Puffer bei 37°C für 60 min inkubiert (anschließende Inaktivierung durch Erhitzen auf 70°C für 10 min).

3.2 Elektrophoresetechniken

3.2.1 Dokumentation von Elektrophoreseexperimenten

3.2.1.1 Färbung von DNA und Protein in Gelen

DNA-Gele wurden, nach der Färbung in 2,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung, im UV-Durchlicht (254 nm) mit einem Molecular Dynamics FluorImager 575 abgetastet und die DNA-Banden, durch Auswertung mit der ImageQuant Software (Version 5.0) quantifiziert.

Proteingele wurden nach der Elektrophorese für 5 min in Fixierlösung [20 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure] inkubiert und nachfolgend 15 min in 0,25 % (w/v) Coomassie Blue R250 (in 50 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Das Entfernen überschüssiger Farbe erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Stunden durch Inkubation in

Fixierlösung. Die Gele wurden anschließend mit dem Personal Densitometer abgebildet und das Bandenmuster mit der ImageQuant Software quantifiziert.

3.2.1.2 Radioaktive Experimente

Gele, die radioaktiv markierte DNA oder DNA-Proteinkomplexe enthielten, wurden bei Raumtemperatur unter Benutzung der *phosphor storage technology* (Johnston *et al.*, 1990) autoradiographiert und mit einem Amersham/Pharmacia Storm PhosphorImager 820 dokumentiert. Die Bandenintensität in den Autoradiogrammen mit der ImageQuant Software bestimmt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung

Plasmide und DNA-Fragmente wurden mittels eindimensionaler Elektrophorese in 0,7 - 1,5 % igen Agarosegelen (10 x 10 x 0,4 cm) analytisch und präparativ aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente Tris-Borat-Puffer (TBE) (siehe 2.5).

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,2 Volumen Ficoll-Puffer (siehe 2.5) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit konstanter Spannung (8 V/cm) für 1,5 - 2 h.

3.2.3 Alkalische Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse

Die alkalischen Agarosegele (1 - 1,5 %) wurden wie neutrale Agarosegele präpariert. Als Gelpuffer wurde jedoch 30 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0) und als Elektrophoresepuffer 30 mM NaOH, 1 mM EDTA (pH 8,0) benutzt.

Der Ficoll-Puffer (siehe 2.5), der zur Probenvorbereitung diente, enthielt 30 mM NaOH anstelle von Tris-HCl. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit konstanter Spannung (5 V/cm) für 2 - 3 h. Der Puffer wurde während des Laufes mehrmals ausgetauscht. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel zur Neutralisation für 30 min in 100 mM Tris-HCl (pH 6,5) inkubiert.

3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA-Proteinkomplexen

Fragmentretentions-Experimente wurden auf 3,5 % igen Polyacrylamidgelen (20 x 20 x 0,2 cm; Acrylamid: Bisacrylamid = 20:1) in einer vertikalen Gelapparatur durchgeführt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente Puffer TAE (siehe 2.5).

Zum Probenauftrag wurde Ficollpuffer (siehe 2.5) ohne SDS und EDTA benutzt. Der Lauf erfolgte bei 4 V/cm für 1,5 - 2 h.

3.2.5 DNA-Sequenzgele

6 % ige Polyacrylamidgele (52 x 20 x 0,02 cm) wurden zur Nukleotidsequenzanalyse in einer thermostatisierbaren Apparatur benutzt (Garoff & Ansorge, 1981). Es mußte sichergestellt werden, daß sich nach der Elektrophorese die Ohrenplatte sauber, mit dem an ihr haftenden Gel, von der Thermostatisierplatte löste. Dazu wurde nach gründlicher Reinigung beider Platten mit Ethanol die Thermostatisierplatte mit 1 ml 2 % igem (v/v) Dichlormethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan (Repel-Silan) eingerieben. Die andere Platte wurde mit ca. 1 ml Bindsilanlösung (75 µl Bindsilan, 25 ml Ethanol, 750 µl 10 % ige (v/v) Essigsäure) behandelt. Die Gele setzten sich zusammen aus:

Acrylamid/Bisacrylamid (20:1)	6 % (w/v)
Harnstoff	8.3 M
Tris-Base	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA (pH 8.0)	2 mM

Die Polymerisation von 50 ml dieser Acrylamidlösung wurde nach dem Entgasen, direkt vor dem Gießen des Gels durch Zugabe von 300 µl 10% igem (w/v) Ammoniumpersulfat und 30 µl TEMED gestartet. Nach ca. 1h war die Polymerisation abgeschlossen. Danach wurde das Gel in der Elektrophoreseapparatur auf 55 °C aufgeheizt und mit Proben versehen. Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 3000 V in TBE-Puffer (siehe 2.5). Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf der mit Bindsilan behandelten Glasplatte im Umluftofen getrocknet (60°C, 45 min).

3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung (SDS-PAGE)

Proteine wurden in vertikalen, diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration im Trenngel für Proteine < 14 kDa. betrug 15 % (w/v) (mit 0,087 % Bisacrylamid) bzw. 17,5 % (w/v) (0,2 % Bisacrylamid). Für beide Gelsysteme betrug die Acrylamidkonzentration des Sammelgels 5

% (w/v). Als Elektrophoresepuffer diente Glycin-Puffer (siehe 2.5). Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer gemischt und die Protein 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 V/cm für 30 min und dann bei 10 V/cm für 1,5 - 2 h.

3.3 Proteinanalyse

3.3.1 Glyceringradientenzentrifugation

3,8 ml eines linearen Glyceringradienten von 15 - 35 % (w/v) Glycerin wurden mit 120 µl (400 µg) gereinigtem TelN Protein aus Fraktion V (siehe 4.1) überschichtet. Es wurde 15 h bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Gradient von unten ausgetropft. Es wurden 14 Fraktionen à 270 µl gesammelt und mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.6) und enzymatisch (siehe 3.5.1) analysiert.

3.3.2 Proteinüberproduktion durch induzierte Genexpression

Übernachtskulturen von *E. coli* Zellen (SCS1), die das gewünschte Expressionsplasmid trugen, wurden ca. 1:40 in YT-Medium verdünnt, bei einer Zelldichte von $A_{600} = 0,5 - 0,6$ mit IPTG (1 mM) induziert und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und entweder zu analytischen Zwecken lysiert (siehe 3.3.3 und 3.3.4) oder für die präparative Proteinreinigung in 10 ml/g Zellnaßgewicht Spermidinmix [20 mM Spermidin; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA] resuspendiert und mit flüssigen Stickstoff gefroren. Die Zellsuspensionen waren bei -70 °C mindestens ein Jahr stabil.

3.3.3 Denaturierender analytischer Zellaufschluss

Die Zellen einer Bakterienkultur (5 ml) wurden in 150 µl/OD_(A600) SDS-Lysemix (0,1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 M NaCl; 5 % (w/v) SDS; 1 M Mercaptoethanol; 15 % (w/v) Glycerin) suspendiert und je 5 min bei 60°C bzw. 100°C inkubiert. Nach Zentrifugation des Lysats (60 min/4°C/100.000 x g/50 Ti-Rotor (Beckman)) wurden die im Überstand gelösten Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.6) analysiert.

3.3.4 Nativer analytischer Zellaufschluss

Ein nativer Zellaufschluß wurde durchgeführt um festzustellen, unter welchen Bedingungen ein Protein löslich ist. Der Zellaufschluß erfolgte durch Kombination enzymatischer und physikalischer Lyse (Lysozym 0,2 mg/ml; Schockgefrieren/Auftauen). Als Lösungsvermittler diente Brij-58 (0,01 %) in Anwesenheit und Abwesenheit von NaCl (1 M). Der so gewonnene Proteinrohextrakt diente auch zur Analyse der Bindungs- und Prozessierungsaktivität von TelN Derivaten.

3.3.5 Nativer präparativer Zellaufschluss

Zu der Spermidinmix-Zellsuspension (3.3.2) wurden 2 Volumina Brij-Lysemix (40 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 M NaCl; 8 % (w/v) Saccharose; 0,5 mg/ml Lysozym; 0,15 % (w/v) Brij-58) gegeben, 90 min bei 4°C gerührt und anschließend zentrifugiert (100.000 x g/60 min/4°C/45 Ti-Rotor (Beckman)). Der Überstand wurde sofort weiterarbeitet.

3.3.6 Proteinreinigung mittels Säulenchromatographie

Die Vorbereitung der Säulenmaterialien erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Säulenmatrices wurden vor Gebrauch in dem Puffer equilibriert, in dem sich die aufzutragende Proteinfraction befand. Die Chromatographie wurde bei einer Flußrate von 1 - 2 Bettvolumina/h und 4°C durchgeführt. Säulenauftrag und Eluat wurden gelelektrophoretisch analysiert.

3.3.7 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran

Für die N-terminale Mikrosequenzierung wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese auf Trägermembranen aus PVDF elektrophoretisch übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Transferpuffer enthielt 300 mM Tris-Base, 20 % Methanol (Anoden-Puffer), bzw. 25 mM Tris-Base, 40 mM ϵ -Amino-Caprinsäure, 20 % Methanol, 0,5 % SDS (Kathoden-Puffer). Der Transfer erfolgte bei 50 V für 90 min.

3.3.8 Proteinsequenzierung

Nach dem Transfer des Proteins auf eine PVDF-Membran (3.3.7) wurden die Proteine 5 min mit Amidoschwarz 0,1 % (w/v) in 50 % (v/v) Methanol gefärbt und die Membran anschließend mit 30 % (v/v) Methanol gewaschen. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (Gevaert & Vandekerckhove, 2000) in der Servicegruppe des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik.

3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

3.4.1 Spreitung und Längenmessung von doppelsträngiger und denaturierter DNA

Die zu analysierende DNA-Probe wurde mittels eines 0,7 % Agarosegels und anschließender Gelextraktion gereinigt. Das isolierte Produkt wurde mit 50 % Formamid, 20 mM Natriumkarbonat, 2 mM EDTA, 0,03 % Cytochrom C vermischt und auf einer Wasseroberfläche gespreitet (Spiess & Lurz, 1988). Nach dem Spreiten wurde die DNA auf ein Kupfer-*grid* aufgebracht welches in der Elektronenmikroskopie als Objektträger fungiert. Um das Produkt denaturiert spreiten zu können, wurde es für 2 min in 100 mM Kalium-Phosphat Puffer, pH 7,0 mit 50 % Formamid, 0,5 % Formaldehyd und 0,5 % Glyoxal gekocht. Nach dem Kochen wurde das denaturierte Produkt in Eiswasser abgekühlt und wie oben beschrieben gespreitet. Zur Längenbestimmung wurde entweder doppelsträngige RSF1010 DNA (8684 bp) oder einzelsträngige ϕ X174 Phagen DNA (5386 nt) als interner Längenstandard zugegeben.

3.4.2 Nachweis von Protein-DNA Komplexen

Die zu analysierende DNA wurde wie in 3.4.1 beschrieben gereinigt und 0,1 pmol DNA wurde mit 1 - 3 pmol Protein in C-KEDT-Puffer für 10 min bei 30°C inkubiert. Für die Glimmeradsorbition (Spiess & Lurz, 1988) wurden die TelN-DNA-Komplexe 10 min mit 0,2 % Glutaraldehyd behandelt, um sie zu vernetzen. 1 μ l des Ansatzes wurde 1:30 in 10 mM Tris-HCl (pH7,6), 10 mM MgCl₂ verdünnt. Die Photos wurden an einem Philips EM400 Elektronenmikroskop gemacht. DNA Moleküle, die Protein gebunden hatten, wurden von 16x vergrößerten Photonegativen auf einem LM4 *digitizer* (Brühl, Nürnberg) vermessen. Die Bindungspositionen wurden ermittelt, wie beschrieben (Lurz *et al.*, 1987).

3.5 Biochemische Analysemethoden

3.5.1 Bestimmung der *cleaving-joining* Aktivität des TelN Proteins

In einem Volumen von 20 µl C-KEDT-Puffer, wurde DNA Substrat (üblicherweise 0,15 pmol) mit verschiedenen Mengen TelN (üblicherweise 25 – 150 U) für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS (final 0,2 % w/v) gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf Agarosegelen (0,7 - 1 %) getrennt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde als eine Einheit TelN die Menge Enzym definiert, die benötigt wird, um 1 pmol Substrat (Form I) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in einer Stunde bei 30°C zu Form III* umzusetzen. Die für diese Arbeit hergestellte Präparation hatte eine spez. Aktivität von 75 U / pmol Protein.

3.5.2 Fragmentretentionstest zur Analyse von DNA-Protein Interaktionen

Protein-DNA-Komplexe weisen eine geringere elektrophoretische Mobilität auf als entsprechende freie DNA. Daher lassen sie sich - bei hinreichender Stabilität - gelelektrophoretisch nachweisen (Ziegelin *et al.*, 1993).

In 20 µl Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 mg/ml BSA, 5 mM MgCl₂), wurden 5'-[³²P] markierte DNA Fragmente (2 - 5 nM) bei 37°C für 30 min mit verschiedenen Mengen des zu testenden Proteins inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf nativen 3,5% igen Polyacrylamidgelen (3.2.4) bei konstanter Spannung (4 V/cm).

3.5.3 DNaseI *footprint* Analyse

DNA-Fragmente mit dem gewünschten Substrat für die DNaseI *footprints*, wurden mittels PCR Amplifikation gewonnen (3.1.3). Jeweils einer der beiden benutzten *primer* war 5'-³²P markiert (3.1.7). Die PCR-Fragmente wurden durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

Die spezifische Bindungsreaktion mit dem Protein fand in 10 µl C-KEDT-Puffer, 80 µM Spermin und 50 µg/ml BSA statt. Dabei wurden verschiedene Mengen Protein mit 5 pmol PCR-Fragment für 30 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein partieller DNA-Verdau mit DNaseI (Galas & Schmitz, 1978; Ziegelin *et al.*, 1989). 1,5 µl DNaseI (0,0015 U, RNase frei) wurde zu den Protein-DNA Komplexen gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNaseI durch Zugabe von 50 µl einer Mischung aus 1 % SDS, 200 mM

NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), 25 µg/ml Lachs-Sperma DNA inaktiviert. Die Reaktionsprodukte wurden phenolextrahiert und mit 70 % igem Ethanol und 100 µg/ml Glycogen als Präzipitationshilfe gefällt.

Das Präzipitat wurde in 5 µl Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM EDTA) aufgenommen und mit 2 µl Formamid/Bromphenolblau-Lösung gemischt. Die Proben wurde für 3 min auf 95°C erhitzt und auf einem 6 % (w/v)-Sequenziergel analysiert (Garoff & Ansorge, 1981; 3.2.5).

Um dem Protektionsmuster eine DNA-Sequenz zuordnen zu können wurde ein *dideoxy cycle sequencing* (Sears *et al.*, 1992) mit Vent® (exo⁻)-DNA Polymerase durchgeführt. *Primer* und *template* waren dieselben wie bei der *footprint*-Analyse. Jeweils 5 µl des Ansatzes wurden auf dem Gel aufgetrennt.

3.5.4 Surface Plasmon Resonance wurde zur Analyse von Protein-DNA Interaktion benutzt

Surface Plasmon Resonance Untersuchungen wurden mit einem BiaCore 2000 Instrument (BiaCore AB) durchgeführt.

Prinzip: Ein Substrat, ist auf einer Meßoberfläche in einer Flußzelle chemisch immobilisiert. Die Masse des immobilisierten Substrats kann gemessen werden (in RU = 1 ng/mm² für Proteine; BIACore Handbook, 1994). Vier Flußzellen sind auf einem *chip* hintereinandergeschaltet, so daß ein in Puffer gelöster Ligand durch alle vier Flußzellen hindurchfließen kann. Bindet der Ligand an das Substrat, ist eine Massenveränderung zu beobachten. Vergleicht man die Massenveränderung eines spezifisch mit dem Liganden interagierenden Substrats mit der eines unspezifisch interagierenden Substrats, kann man Aussagen über die Stöchiometrie der Reaktion machen, vorausgesetzt die Molmassen von Substrat und Ligand sind bekannt.

Durchführung: Aus Oligonukelotiden (Tab. 3) wurden zwei ds-DNA Fragmente durch Hybridisierung hergestellt: ein Fragment enthielt das gewünschte Substrat, das andere enthielt eine randomisierte DNA Sequenz. Beide Fragmente waren an einem Ende biotinyliert. Die Meßoberfläche der Flußzelle war mit Streptavidin beschichtet und ermöglichte so die Immobilisierung des Substrats mittels der starken Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. Jeweils ca. 170 RU jedes DNA-Fragments wurde auf einem SA Sensorchip in verschiedenen Flußzellen nach Angaben des Herstellers immobilisiert. Vorbereitete Proteinlösungen (10 -

5000 nM) wurde mit 1 oder 2 ng/ μ l Kalbsthymus-DNA versetzt und über die in den Flußzellen immobilisierte DNA geleitet (Flußrate: 40 μ l/min; 25°C). Die Resonanzantwort, die Differenz der gemessenen RU in beiden Flußzellen, gibt Aufschluß über die Stöchiometrie der Reaktion. Nach der Messung wurden die entstandenen Komplexe mit Puffer gewaschen, um dem Protein eine Dissoziation von der DNA zu ermöglichen und das Substrat zu regenerieren.

Da - bei gleicher Molmasse - die Resonanz-Antwort (in RU) von 1 pmol Doppelstrang-DNA größer ist, als die von 1 pmol Protein (Fisher & Fivash, 1994; Fivash *et al.*, 1998), muß ein Korrekturfaktor für ds-DNA angewandt werden. Die Messungen wurden daher mit dem Faktor $RU_{\text{protein}} = 0,73 RU_{\text{dsDNA}}$ (Speck *et al.*, 1999) korrigiert. Die Daten wurden unter Benutzung der BIAevaluate Software Version 3.0 (BiaCore AB) ausgewertet.