

**DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors ABF1
aus *S. cerevisiae*:
Spezifität und Kontaktpunkte**

Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
der Fakultät Biologie/Chemie/Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Rasa Beinoravičiūtė-Kellner

aus Vilnius, Litauen

Bayreuth 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis Mai 2002 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerhard Krauss angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am:	16.06.02
Zulassung durch die Promotionskommission:	19.06.02
Wissenschaftliches Kolloquium:	24.10.02

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Rösch

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. E. Komor (Vorsitzender)
Prof. Dr. G. Krauss (Erstgutachter)
Prof. Dr. Dr. hc. M. Sprinzi (Zweitgutachter)
Prof. Dr. G. Krausch
Prof. Dr. W. Schumann

Mano Têveliâms

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>vi</i>
1. Einleitung	1
1.1. ARS Binding Factor 1 (ABF1) aus <i>S. cerevisiae</i>	1
1.2. UV-induzierte Quervernetzungen von Proteinen mit DNA	6
1.3. Biosensoren und ihre Anwendung für die Untersuchung der Reaktionskinetik	8
1.4. In vitro Selektion funktioneller Protein- und Nukleinsäuremoleküle	11
1.4.1. Grundlagen und Anwendungen.....	11
1.4.2. Selektionsexperimente in vitro für die Charakterisierung von Protein-Nukleinsäure- Wechselwirkungen	14
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	16
2. Materialien	17
2.1. Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.1. Allgemeine Chemikalien.....	17
2.1.2. Radiochemikalien.....	17
2.1.3. Proteine und Enzyme	17
2.1.4. Chromatographiematerialien.....	18
2.1.5. DNA- und Proteinstandards	18
2.2. Bakterienstämme und Plasmide	18
2.3. Oligodesoxyribonukleotide	19
2.4. Nährmedien und Lösungen	22
2.5. Kommerzielle Kits	25
2.5.1. DNA Reinigungs- und Modifikationskits	25
2.5.2. Protein-Bestimmungs-, Reinigungs- und Modifikationskits.....	25
2.6. Geräte und andere Materialien	25
3. Methoden	27
3.1. Standardmethoden	27
3.1.1. Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen.....	27
3.1.1.1. UV-Spektrometrie	27
3.1.1.2. Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung	27
3.1.2. Visualisierung von Proteinen und DANN.....	27
3.1.2.1. Coomassie-Färbung	27
3.1.2.2. Silberfärbung.....	28
3.1.2.3. Ethidiumbromidfärbung.....	28
3.1.2.4. PVDF-Membran Färbung mit Amidoschwarz.....	28
3.1.2.5. Detektion von radioaktiv markierten Proben	28
3.1.3. DNA Hybridisierung.....	28
3.1.4. Proteintransfer auf PVDF-Membran.....	28

3.1.5. Anzuchtbedingungen für Bakterien und Hefe	29
3.1.6. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von DNA.....	29
3.1.6.1. CaCl ₂ -kompetente Zellen.....	29
3.1.6.2. Elektroporation	30
3.2. Standardmethoden für Gelelektrophorese	30
3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2.2. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	30
3.2.3. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	31
3.2.4. SDS-PAGE nach Laemmli	31
3.2.5. SDS-PAGE nach Schägger-Jagow	31
3.3. Isolierung und Reinigung von DNA.....	32
3.3.1. Phenolextraktion und Ethanol-fällung	32
3.3.2. Plasmidisolierung im analytischen Maßstab	32
3.3.3. Reinigung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten über PAGE	32
3.3.4. Reinigung der DNA-Spaltungs- und PCR-Produkten.....	33
3.4. Enzymatische Behandlung von DNA.....	33
3.4.1. Enzymatischer DNA-Verdau und Dephosphorylierung.....	33
3.4.2. 5'-Phosphorylierung mit T4 Polynukleotidkinase	33
3.4.3. Ligation	33
3.4.4. DNA-Amplifikation (PCR)	34
3.4.4.1. Kolonien-PCR	34
3.4.4.2. „In Gel“-PCR	34
3.4.4.3. PCR-vermittelte Erzeugung eines Expressionsvektors	34
3.4.4.4. PCR-vermittelte Erzeugung von ARS1-Element	35
3.5. Chromatographische ABF1-Reinigung.....	35
3.5.1. Überexpression von ABF1 in E. coli.....	35
3.5.2. FPLC-unterstützte Säulenchromatographie	36
3.5.2.1. Anreicherung von ABF1 über Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie.....	36
3.5.2.2. Reinigung von ABF1 mittels Ionenaustausch-Chromatographie.....	36
3.5.3. Reinigung von ABF1 in analytischem Maßstab.....	36
3.5.4. Gelfiltration mittels HPLC	37
3.6. Untersuchung der ABF1-DNA-Wechselwirkung	37
3.6.1. Gelretardationsexperimente.....	37
3.6.2. DNA-Selektion in vitro	38
3.6.3. SPR-Messung der ABF1-DNA-Bindungskinetik	38
3.6.4. Quervernetzungsexperimente	40
3.6.4.1. Laservermittelte Photoquervernetzung.....	40
3.6.4.2. Protein-DNA-Quervernetzung mittels UV-B und UV-C Bestrahlung.....	40
3.6.4.3. Chemische Protein-Protein-Quervernetzung.....	40
3.7. Reinigung und Untersuchung von ABF1-DNA-Quervernetzungsprodukten	41
3.7.1. Elution aus präparativem Laemmli-Gel	41
3.7.1.1. Diffusionsbedingte Elution aus SDS-PAAG.....	41
3.7.1.2. Elektroelution	41
3.7.2. Fällung und Konzentrierung des Protein-DNA-Komplexes	41
3.7.2.1. Acetonfällung	41
3.7.2.2. Phenol/Ether Extraktion	42
3.7.2.3. Methanol/Chloroform Präzipitation	42

3.7.2.4. QIAEX II Protokoll für DNA-Reinigung und Konzentrierung	42
3.7.3. Chromatographische Reinigung des kovalenten ABF1-DNA-Komplexes bzw. Spaltungsproduktes	42
3.7.4. Chemische Spaltung und enzymatischer Verdau der Quervernetzungsprodukten	43
3.7.4.1. Limitierender ABF1-DNA Spaltung mit Trypsin und Analyse erhaltener Fragmenten.....	43
3.7.4.2. Enzymatischer Verdau	43
3.7.4.3. Proteinspaltung mit Hydroxylamin.....	44
3.7.4.4. Chemische Proteinspaltung mit NTCB.....	44
3.7.4.5. DNA-Spaltung mit Phosphodiesterasen.....	44
3.7.5. Untersuchung der Spaltungsprodukte mittels MALDI-MS	44
4. Ergebnisse	47
4.1. Präparation von ABF1 und Analyse der ABF1-Multimerisierung	47
4.1.1. Säulenchromatographische Reinigung des rekombinanten ABF1-Proteins	47
4.1.2. Analyse der Dimerbildung des ABF1-Proteins.....	49
4.1.3. Überexpression und Reinigung der ABF1-Domäne	50
4.2. DNA-Bindungseigenschaften von ABF1	51
4.2.1. Untersuchung der ABF1-Bindesequenz mittels DNA-SELEX	51
4.2.1.1. Bestimmung der DNA-Bindesequenz in vitro	52
4.2.1.2. Vergleich der DNA-Bindesequenzen und Bestimmung des Konsensusmotivs für die ABF1-Bindung.....	54
4.2.2. Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen DNA und ABF1	59
4.2.2.1. K_D -Bestimmung für Oligonukleotide nach SELEX	59
4.2.2.2. Analyse der ABF1-Bindungseigenschaften mit ARS-Elementen und Promotorsequenzen.....	62
4.2.2.3. ABF1-Bindung an methylierte ARS1-Sequenzen	67
4.2.3. Bestimmung des ABF1-Oligomerisierungszustands in der Anwesenheit von DNA	69
4.2.4. SPR-Analyse der ABF1-DNA-Reaktionskinetik.....	70
4.3. Photoquervernetzungsexperimente zur Bestimmung der ABF1-DNA-Kontaktpunkte	80
4.3.1. Optimierung der Quervernetzungsbedingungen	81
4.3.1.1. Vergleich der Oligonukleotide in Quervernetzungsexperimenten mit ABF1.....	81
4.3.1.2. Optimierung der Bedingungen für die Quervernetzungsreaktion zwischen ABF1 und ARS1-Element	82
4.3.2. Bestimmung der DNA-Bindungsdomäne des ABF1's	83
4.3.2.1. Reinigung und Konzentrierung des Protein-DNA-Komplexes	83
4.3.2.2. Chemische Spaltung des ABF1-DNA-Quervernetzungsproduktes	85
4.3.2.3. Tryptischer Verdau des ABF1-DNA-Komplexes.....	86
4.3.3. Identifizierung der ABF1-Kontaktpunkte im kovalenten ABF1-ARS1-Komplex mittels MALDI-MS.....	87
5. Diskussion	91
5.1. Untersuchung der ABF1-Erkennungsmotive auf dsDNA mittels SELEX-Experimenten	91
5.2. SPR-Analyse der ABF1-Bindungskinetik.....	95
5.3. ABF1-Bindung an die ABF1-spezifische DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	97

5.4. Vergleich der Methoden für die Untersuchung der Protein-DNA-Bindung	99
5.5. Einfluss der DNA-Methylierung auf die Protein-Bindung.....	102
5.6. Bestimmung der Kontaktpunkte im ABF1-DNA-Komplex	103
6. Zusammenfassung.....	107
7. Summary.....	109
8. Anhang.....	111
8.1. Vergleich der selektierten Sequenzen mit genomischer S. cerevisiae DNA	111
8.2. Berechnung der Gleichgewichtskonstanten	113
8.3. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten.....	114
8.3.1. Assoziationskinetik	114
8.3.2. Dissoziationskinetik	116
8.3.3. Berechnung der Standardabweichung	117
8.4. Zusammenfassung der ABF1-DNA-Bindungskonstanten nach SPR-Messung.....	118
8.5. Mittels MALDI-MS identifizierte ABF1-Peptide.....	120
9. Literaturverzeichnis.....	123

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABF1	ARS Bindungsfaktor 1
Ampicillin	6-[D(-)- α -Aminophenylacetamido]-penicillansäure, Natriumsalz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	Autonomously Replicating Sequence
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
C	Cytosin
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMS	Dimethyl Suberimidate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electromobility shift assay
F	Fluorescein
FPLC	fast protein liquid chromatography
G	Guanin
HCCA	α -Hydroxycyanozimtsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperacinethansulfonsäure
HMW	Hochmolekularer Proteinstandard (<i>high molecular weight</i>)
HPLC	high pressure/performance liquid chromatography
I, 5-IdU	5-Iod-2'-deoxyuridin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
k_A	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
kbp	1000 Basenpaare
k_d	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
K_D	Dissoziationskonstante/ Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
k_t	Konstante für Massentransport
LMP	Low melting point
LMW	Niedermolekularer Proteinstandard (<i>low molecular weight</i>)

MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/-ionisations-Massenspektrometrie
MOPS	γ -Morpholinopropansulfonsäure
NS	Nukleinsäure
NTCB	2-Nitro-5-Thiocyanobenzoil-Säure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
pl	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QP	Quervernetzungsprodukt
rABF1	rekombinanter ARS Bindungsfaktor 1
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Response unit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	S ystematic E volution of L igands by EX ponential enrichments
SpQP	Verdautes Quervernetzungsprodukt
ssDNA	einzelsträngige DNA
T / T	Thymin / <i>Temperatur</i>
t	Zeit
T4-PNK	Phage T4 Polynukleotidkinase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box Binding Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. ARS Binding Factor 1 (ABF1) aus *S. cerevisiae*

Im Jahr 1979 wurde die erste DNA-Sequenz in Hefe beschrieben, die eine extrachromosomale Replikation von zirkularisierter DNA begünstigt (Stinchcomb *et al.* 1979). Die Entdeckung weiterer sogenannten ARS-Elemente (*Autonomously Replicating Sequences*) führte dann zum Nachweis dieser Sequenzen als Startpunkte der Replikation *in vivo* (Brewer & Fangman 1994). Mit Hilfe von Sequenzvergleich und von Mutations- bzw. Deletionsanalyse wurden verschiedene konservierte Bereiche in den ARS-Elementen aus *S. cerevisiae* identifiziert (Abb. 1-1).

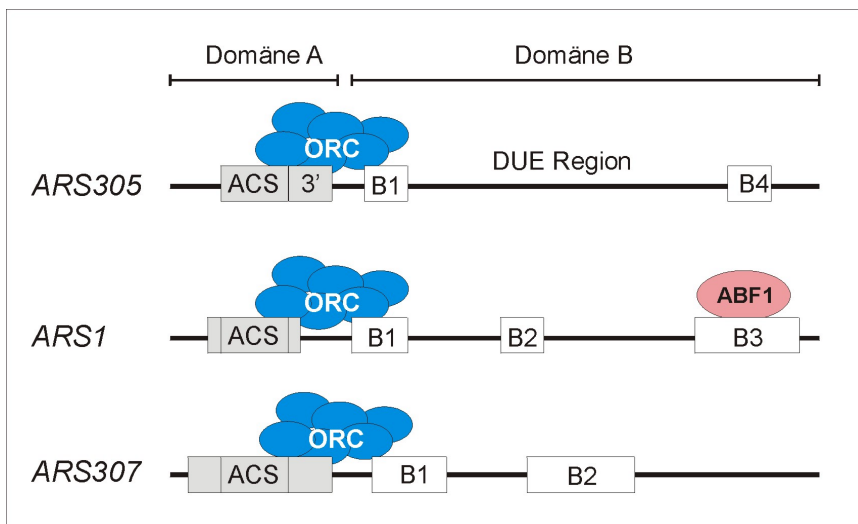


Abb. 1-1 Vergleich der Aufbau von den ARS-Elementen aus *S. cerevisiae*. Dargestellt sind die konservierten Sequenzen in der Domäne A (ACS) und B (B1, B2, B3, B4), *DNA Unwinding Element* (DUE) in der Domäne B. An ACS und B1-Box bindender Proteinkomplex ORC wurde blau und an B3-Box bindendes ABF1-Protein wurde rot markiert (nach (Huang & Kowalski 1996; Lin & Kowalski 1997).

Die ARS-Elemente aus *S. cerevisiae* sind 100–200 bp lange und A/T-reiche Sequenzabschnitte, die als wichtigstes Element die ACS (*ARS core Consensus Sequence*) enthalten. Diese 11 bp lange Sequenz (Domäne A) sowie die Box B1 aus der Domäne B ist in allen bekannten ARS-Motiven zu finden (Kearsey 1984; Van Houten & Newlon 1990). Am 3'-Ende des T-reichen ACS-Stranges befindet sich eine 3'-Box, die entweder für die Proteinbindung wichtig ist oder eine bestimmte DNA-Konformation begünstigt. Die darauf folgende Domäne B ist von variabler Zusammensetzung bei den verschiedenen ARS-Elementen und besteht z. B. im Fall des am besten untersuchten ARS1 aus drei Motiven (B1, B2, B3). In der Domäne B mehrerer ARS wurde eine DUE-Sequenz (*DNA Unwinding Element*) detektiert, die eine helikale Instabilität der DNA verursacht (Huang & Kowalski 1993; Natale *et al.* 1992). In ARS305 befindet sich die DUE-Region zwischen Box B1 und B4, in ARS1 und ARS307 übernimmt die B2-Region die DUE-Funktion. ARS307-Element enthält nur die B1- und B2-Box, die ausreichend für die ARS-Funktion sind. Die B3-Sequenz, die in ARS1 stark ausgeprägt ist, wurde in anderen ARS-Elementen (ARS307, ARS305) nicht gefunden (Huang & Kowalski 1996; Lin & Kowalski 1997). Trotz Unterschiede zwischen den Domä-

nen B der ARS-Elemente, spielen die Domänen A und B eine essentielle Rolle in der DNA-Replikation (Clyne & Kelly 1997).

Das große Interesse am Replikationsprozess der Zelle sowie die detaillierte Analyse der ARS-Funktion führte zur Entdeckung von mehreren ARS-bindenden Proteinen. Darunter befinden sich das unspezifisch ssDNA-bindende Replikationsprotein A (RPA) (Henricksen *et al.* 1994), sowie ein spezifisch den T-reichen ARS1-Strang bindendes Protein (Schmidt *et al.* 1991), das später als Adenylosuccinat-Synthetase identifiziert wurde (Gallert *et al.* 1996; Zeidler *et al.* 1993). Ein weiteres, den T-reichen Strang bindendes Protein Abp1 (ARS Binding Protein 1) aus *S. pombe* wurde dagegen als ein Faktor, der an der Replikation und Chromosomsegregation beteiligt ist, beschrieben (Murakami *et al.* 1996). Ein ACS- und B1-Motive bindender Proteinkomplex ORC (**O**ri**R**igin **R**ecognition **C**omplex), der essentiell für den Replikationsprozess ist, wurde erstmals 1992 aus *S. cerevisiae* isoliert (Bell & Stillman 1992) und später detailliert charakterisiert (Lee & Bell 1997). Konservierte ORC-Proteine wurden im Folgenden auch in anderen Eukaryonten (*S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. leavis*, *H. sapiens*) identifiziert und isoliert (Gossen *et al.* 1995; Lee *et al.* 2001; Moon *et al.* 1999; Rowles *et al.* 1996; Tugal *et al.* 1998; Vashee *et al.* 2001).

Das ABF1-Protein (**A**RS **B**inding **F**actor 1) wurde als erstes Protein, das spezifisch an die B3-Box im ARS1 bindet, biochemisch von mehreren Arbeitsgruppen fast gleichzeitig in *S. cerevisiae* gefunden (Buchman & Kornberg 1990; Diffley & Stillman 1988; Dorsman *et al.* 1991; Eisenberg *et al.* 1988; Halfter *et al.* 1989b; Sweder *et al.* 1988).

Aus *Kluyveromyces lactis* und *K. marxianus* wurden ABF1-homologe Proteine isoliert (Goncalves *et al.* 1992; Obery *et al.* 1993). ABF1-Bindeaktivität wurde auch in den Rohextrakten anderer Hefegattungen *Pichia* und *Debaryomyces* (Pretorius & Muller 1992) sowie *S. exiguus* (persönliche Beobachtung) nachgewiesen. Aus dem Sequenzvergleich der ABF1-Proteine aus *K. marxianus* (496 AS), *K. lactis* (486 AS) und *S. cerevisiae* (731 AS) geht hervor, dass konservierte Bereiche zwischen den Aminosäuren 9–78, 323–439, 646–662 und 717–731 (*S. cerevisiae* ABF1-Sequenz) liegen und mit der Proteinfunktion eng verbunden sein müssen.

Mit Hilfe von „Footprint“-Experimenten, Sequenzvergleichen und Mutation der Bindestellen wurde eine konservierte DNA-Bindesequenz 5'-CGTNNNNRRYGAY-3' für den ABF1 aus *S. cerevisiae* bestimmt (Halfter *et al.* 1989b). Diese ABF1-Bindungsmotive wurden ebenfalls in anderen Hefegattungen und Organismen wie *Schizochaccharomyces pombe*, *D. melanogaster* (Schroeder & Weil 1998a), *S. exiguus* identifiziert. ABF1-Konsensusbindungsmotive finden sich in vielen, aber nicht allen (Huang & Kowalski 1996) ARS-Elementen und in Promotorregionen zahlreicher Hefegene (Della Seta *et al.* 1990a). In der Promotorregion des TBP-Gens (TATA-Box Binding Protein) wurde ein ABF1-Bindungsmotiv PED (Positiv Element Distal) (5'-CGTAAATAGTTTATCT-3') identifiziert, das von der Konsensusbindesequenz abweicht (markiert). PED-ähnliche Sequenzen finden

sich auch in den Gensequenzen der Transkriptionsfaktoren RPB11, SRB4, SRB7 (Schroeder & Weil 1998a).

Nach der Identifizierung der ABF1-Bindemotive konnte eine ABF1-Bindung an verschiedene ARS-Elemente sowie eine Stimulation der DNA-Replikation vor allem von ARS1 nachgewiesen werden (Diffley & Cocker 1992; Diffley & Stillman 1988; Li *et al.* 1998; Marilley 2000; Sweder *et al.* 1988; Walker *et al.* 1990). Sequenzbedingte Unterschiede der ABF1-Funktion sind trotz ähnlicher ABF1-Erkennungsmotive in den verschiedenen ARS-Elementen nicht ausgeschlossen. So wird z. B. eine stabilisierende ABF1-Wirkung auf den Replikationskomplex im ARS1-Element vermutet, während für den ARS121-Origin eine eindeutige ABF1-Aktivierung gefunden wird (Kohzaki *et al.* 1999; Wiltshire *et al.* 1997). Im ARS1-Element kann das ABF1-Bindungsmotiv ohne großen Funktionsverlust im Gegensatz zu dem DNA-Motiv in der ARS121 gegen Bindungssequenzen der anderen Transkriptionsfaktoren, z. B. GAL4, ausgetauscht werden (Marahrens & Stillman 1992). Die ARS305- und ARS307-Elemente besitzen keine B3-Box, die für die ABF1-Bindung notwendig ist (Huang & Kowalski 1996). Das Einfügen des ABF1-Bindemotivs in das ARS301- bzw. ARS608-Element führt zu einer Inhibition der Replikation im Gegenteil zur Replikationsaktivierung von dem ARS1- und ARS121-Origin (Kohzaki *et al.* 1999). In dem ARS121-Element zeigt sich der ABF1 als distanz- und orientationsunabhängige Transkriptionsaktivator (Rowley *et al.* 1994). Das waren die ersten Hinweise auf zusätzliche Funktionen von ABF1. Später wurde der ABF1 auch als ein Faktor, der spezifisch an Promotorregionen (Kang *et al.* 1995) bzw. GA-reiche Sequenzen (Springer *et al.* 1997) bindet, neu entdeckt.

Das ABF1-Protein zeigt nicht nur eine Funktionshomologie zu dem Transkriptionsfaktor RAP1 sondern auch eine gewisse Sequenzhomologie im C-terminalen Bereich (Diffley & Stillman 1989; Miyake *et al.* 2002). Beide Proteine sind gegenseitig austauschbar in Transkriptionsaktivierungsexperimenten (Goncalves *et al.* 1995; Martens & Brandl 1994; Packham *et al.* 1996). Dies spricht für eine ähnlich Funktion der beiden Proteine in der Transkription (Angermayr & Bandlow 1997).

ABF1 kommt in der Zelle in hoher Konzentration vor (ca. 5000–10000 ABF1-Moleküle/Zelle) (Schroeder & Weil 1998a) und ist für das Wachstum der Zelle essentiell. Andererseits führt eine Überexpression des Proteins in Hefe zu einer starken Inhibition des normalen Zellwachstums (Halfter *et al.* 1989a; Rhode *et al.* 1992). Das *abf1*-Gen enthält fünf ABF1-Bindungssequenzen in der Promotorregion, was auf eine Autoregulation der ABF1-Expression hindeutet (Halfter *et al.* 1989a). Das Protein nimmt aufgrund seiner Aktivator- bzw. Repressoreigenschaften an verschiedensten Zellprozessen teil, wie Meiosis und Sporulation (Gailus-Durner *et al.* 1996), Funktion der Ribosomen (Della Seta *et al.* 1990a; Kraakman *et al.* 1993), Regulation des C-Stoffwechsels (Silve *et al.* 1992), N-Metabolismus (Kovari & Cooper 1991) und Biogenese der Mitochondrien (De Winde *et al.* 1993). ABF1 ist außerdem an der GCN4-unabhängigen Transkriptionsregulation von Enzymen der Aminosäurebiosynthese beteiligt (Kunzler *et al.* 1995). ABF1 ist ebenfalls in der

Lage, die Genexpression in *silenced mating-type* Locus (Loo *et al.* 1995), sowie in Telomeren (Biswas & Biswas 1990; Heukeshoven & Dernick 1988) zu verhindern. Der multifunktionelle Transkriptionsfaktor nimmt auch noch an der Nukleotid-Exzisionsreparatur in transkriptions-inaktiven Chromosomregionen teil (Reed *et al.* 1999).

Transkriptionsfaktoren können die Topologie der DNA am Promotor verändern, indem sie eine Biegung der DNA verursachen. Eine Krümmung der DNA verändert die Distanz zwischen benachbarten DNA-Bindungsproteinen und kann eine nukleosomen-freie Region induzieren (Rolfes *et al.* 1997). Seit 1994 ist bekannt, dass die ABF1-Bindung eine Biegung der DNA um 120° nach sich zieht (McBroom & Sadowski 1994). Ein Einfluss von ABF1 auf die Topologie der DNA und die Chromatinstruktur wird durch die Beobachtung nahe gelegt, dass die Bindung des Proteins eine Nukleosomenbildung an der ARS A-Box verhindert (Venditti *et al.* 1994) und eine lokale Änderung der Chromatinstruktur erzeugt. Diese ABF1-abhängige Nukleosomen-Rekonfiguration an ARS1 ist für die Entstehung des Prereplikationskomplexes essentiell (Lascaris *et al.* 2000). Ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss von ABF1- auf die Chromatinstruktur ist der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen ABF1 und der Histon-Acetyltransferase Esa1 (Reid *et al.* 2000). Eine solche Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen zum Chromatin wird benötigt, um die Nukleosomen-Struktur aufzulockern und den Transkriptionsstart zu erleichtern.

Im Jahr 1998 haben Schröder *et al.* die ABF1-Eigenschaften in vier hypothetischen Funktionsmodellen in Bezug auf die DNA-Bindung und Protein-Protein-Wechselwirkung zusammengefasst, in denen das ABF1-Protein als ein Antirepressor nach der DNA-Bindung aktiv ist, die Eigenschaften des architektonischen Transkriptionsfaktors aufweist oder eine kooperative Bindung anderen Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion stimuliert (Schröder & Weil 1998b). Diese multiplen ABF1-Funktionen verbergen sich hinter einer Proteinstruktur, die aus zwei DNA-Bindungsdomäne – einem essentiellen Zink-Finger-Motiv (49–71 AS) und einem für die spezifische DNA-Bindung verantwortlichen Helix-Turn-Helix-Motiv (323–496 AS) (Cho *et al.* 1995) – sowie aus einer *trans*-Aktivationsdomäne (608–731 AS), besteht (Abb. 1-2). Über die Transaktivierungsdomäne werden Wechselwirkungen mit dem basalen Transkriptionsapparat sowie vermutlich mit Komponenten des Replikations-Initiationskomplexes vermittelt (Li *et al.* 1998). ABF1 besitzt ein atypisches Zink-Finger-Motiv CysX₇HisX₃HisX₄CysX₄Cys, das aus drei Cys-Resten und drei His-Resten besteht (Diffley & Stillman 1989; Rhode *et al.* 1989). Aus Mutationsexperimenten geht hervor, dass Cys71 und His57 an der Bildung der Zinkfingerstruktur beteiligt sind und zusammen mit Zn²⁺ eine DNA-bindungsaktive Struktur bilden (Halfter *et al.* 1989a). Mutationen H61A, C66R, H67D, K69E im Zinkfinger verursachen ebenfalls den Verlust der DNA-Bindungsaktivität des ABF1's (Cho *et al.* 1995).

Das HTH-Motiv enthält Gly in der Schleife und einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren. Dieses DNA-Bindungsmotiv ist nicht in der Lage, allein eine stabile Domäne zu bilden und übt seine Funktion nur in Gegenwart von anderen DNA-Bindungsdomänen aus

(Pabo & Sauer 1992). Bei ABF1 erhöht das HTH-Motiv die Spezifität der DNA-Bindung (Diffley 1992). Mutationen in diesem Bereich schwächen (Y403H, G404K) oder eliminieren (L353R, L360R, K434T, L399E, F410P) die Fähigkeit von ABF1, eine DNA spezifisch zu binden. Die Deletion der Region zwischen Zinkfinger und HTH-Motiv (AS 200–265) beeinträchtigt dagegen die DNA-Bindung nicht (Cho *et al.* 1995).

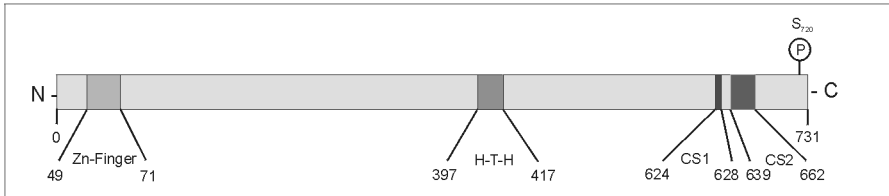


Abb. 1-2 Lage der funktionellen Domäne und modifizierten Aminosäuren auf dem ABF1-Protein. Die Zahlen geben die Aminosäure-Positionen an. S720 ist phosphoryliert; DNA-Erkennungs- und Bindemotive: Zink-Finger- und Helix-Turn-Helix-Motiv (H-T-H); CS1 und CS2: C-terminale Sequenzen (nach (Cho *et al.* 1995; Miyake *et al.* 2002)).

Ein Bereich von 530 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins ist für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich (Halfter *et al.* 1989a). Die negativ geladene C-terminale Domäne bedingt dagegen die ABF1-Eigenschaften als Transkriptions- und Replikationsfaktor (Li *et al.* 1998; Li 1999) und ist für die Vitalität der Zelle essenziell (Rhode *et al.* 1989; Rhode *et al.* 1992). Mittels einer Deletionsanalyse wurden zwei Regionen in der Aktivationsdomäne des Proteins bestimmt, derer Deletion zur Letalität der *S. cerevisiae* Zellen führt. Die CS1-Region (624–628 AS) ist für kontext-abhängige Prozesse wie *Gensilencing* und/oder Transkriptionsrepression verantwortlich. Mutation der CS2-Region (639–662 AS) beeinflusst alle ABF1-Funktionen – Aktivierung der Transkription und DNA-Replikation, *Gensilencing* und Chromatinremodeling (Miyake *et al.* 2002).

Die Aktivität des ABF1-Proteins wird höchstwahrscheinlich durch eine Phosphorylierung an Ser- und Thr-Resten gesteuert (Francesconi & Eisenberg 1991). Es wurden mehrere ABF1-Spezies, die ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im PAGE zeigen, identifiziert (Jung *et al.* 1995; Silve *et al.* 1992; Sweder *et al.* 1988). Die Bedeutung der Phosphorylierung für die ABF1-Funktion ist noch offen. ABF1-Erkennungsmotive befinden sich nicht nur in ARS-Elementen, sondern auch in URS-Regionen (*Upstream Regulating Sequences*) verschiedener Gene. Insgesamt ist noch nicht geklärt, nach welchem Mechanismus ABF1 zu einer Stimulation der Transkription führt. Weiterhin ist die Ursache für den *Gensilencing*-Effekt von ABF1, der für einige Gene beschrieben ist, unbekannt (Enomoto *et al.* 1994; Triolo & Sternglanz 1996). Hier wird diskutiert, dass ABF1 nur eine indirekte Funktion beim *Silencing* trägt und wahrscheinlich eine Rekrutierung der SIR-Proteine bzw. Histone unterstützt (Gartenberg 2000; Rivier *et al.* 1999).

Bis jetzt liegen noch keine hochaufgelösten Strukturinformationen für ABF1 vor. Der Mechanismus der ABF1-Bindung an die DNA ist offen und die Frage nach den Anforderungen für das zugehörige DNA-Bindungselement ist noch unbeantwortet.

1.2. UV-induzierte Quervernetzungen von Proteinen mit DNA

Die Methode der UV-induzierten Quervernetzung von DNA ist ein wichtiges Verfahren zur Gewinnung erster Strukturinformationen von Protein-DNA-Komplexen. Mit diesem Verfahren können Kontaktpunkte zwischen Protein und DNA sowohl auf Proteinseite als auch auf DNA-Seite identifiziert werden.

Die Bestrahlung von Protein-DNA-Komplexen mit UV-Licht führt zur Entstehung von quervernetzten Komplexen, ist aber nicht sehr effizient und wenig spezifisch. Die Ausbeuten der Reaktion liegen oftmals unter 30 % (Meisenheimer & Koch 1997; Shamo *et al.* 1988) und führen nur in seltenen Fällen zu einer 80 %igen Quervernetzung (Merrill *et al.* 1988; Williams & Konigsberg 1991). Die Entstehung von unerwünschten Addukten wie Pyrimidindimeren, unspezifischen DNA-DNA- bzw. Protein-DNA-Komplexen kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Als besonders reaktiv in DNA-Quervernetzungsexperimenten gelten die Aminosäuren Lys, Cys, Phe, Trp und Tyr. His, Glu und Asp sind dagegen nur mäßig aktiv (Shetlar *et al.* 1984).

Die Verwendung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten, die mit photoreaktiven Gruppen modifiziert sind, ermöglicht eine Bestrahlung der Komplexe mit Licht außerhalb des Absorptionsbereichs der DNA-Basen (>300 nm) (Tasset *et al.* 1997). Dadurch können nicht nur Proteinschäden und die Bildung von unspezifischen Komplexen vermieden werden (Stump & Hall 1995), sondern es können auch sehr hohe Quervernetzungsausbeuten (bis 95 %) erzielt werden (Meisenheimer & Koch 1997). In der großen Anzahl photoreaktiver Nukleotidanaloga sind zwei Gruppen zu unterscheiden: „zero-length“-Quervernetzer und solche, bei denen die photoreaktive Gruppe mehrere Å von der Base entfernt liegt. Ein Beispiel für letztere sind Arylazid-Derivate, die an das Phosphatrückgrat der DNA (Yang & Nash 1994), bzw. an die Base angebracht werden. Auf diese Weise können auch die Proteine, die nicht im direkten Kontakt mit dem Nukleotidanaloga stehen, mit dem DNA-Fragment quervernetzt werden (Lannutti *et al.* 1996; Tate *et al.* 1998; Zofall & Bartholomew 2000).

Für die Bestimmung spezifischer DNA-Protein-Kontaktpunkte sind die „zero-length“-Quervernetzer am besten geeignet. Bei diesen Verbindungen ist eine Quervernetzung nur dann möglich, wenn der Chromophor in direktem Kontakt mit dem Protein steht. 5-Halogenderivate (Hicke *et al.* 1994; Willis *et al.* 1993), Azidoverbindungen (Martin *et al.* 1993) bzw. 4-Thionukleosidanaloga (Favre *et al.* 1998) haben eine breite Anwendung in der Photochemie der Protein-DNA-Komplexe gefunden. Die wichtigsten Vertreter dieser Nukleotidanaloga sind in der Abb. 1-3 dargestellt. Der Van-der-Waals-Radius des Iodatoms im 5-IdU ist mit dem Radius der Methylgruppe vergleichbar. Folglich wird die DNA-Struktur durch diese Substitution sowie durch den Einbau der kleinen 5-Brom- bzw. 4-Thiogruppe nur unwesentlich verändert.

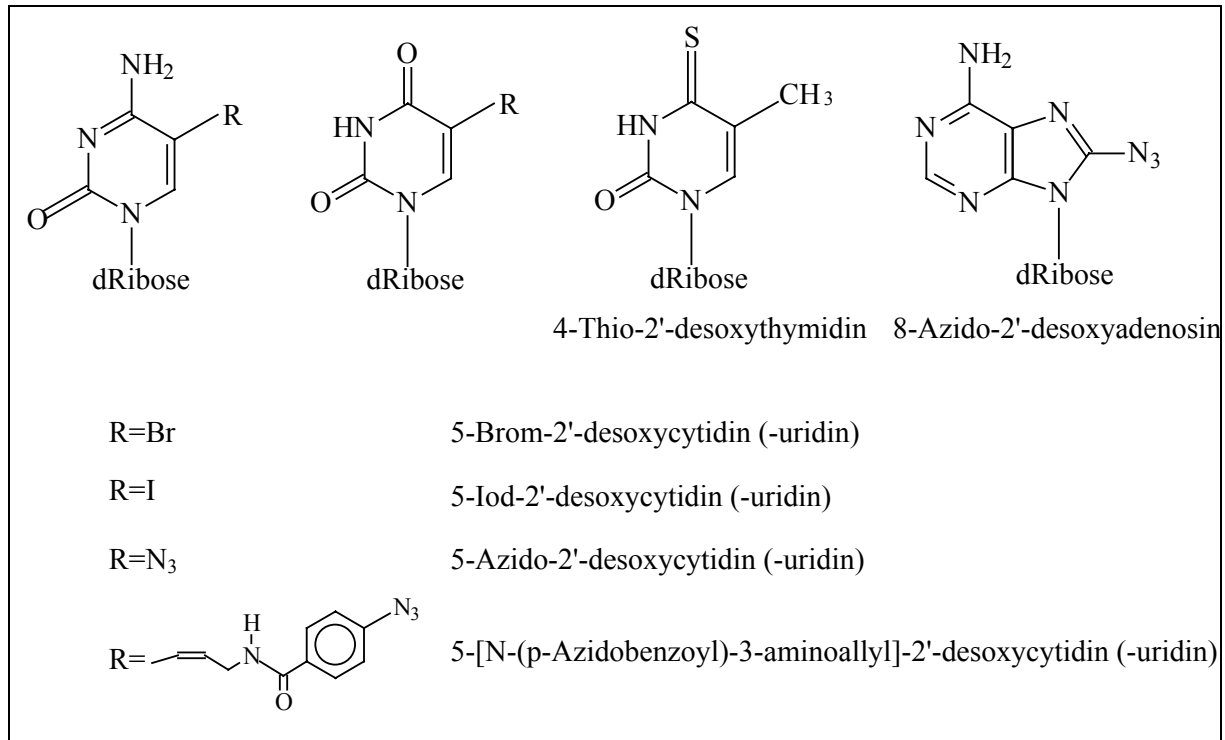


Abb. 1-3 Photoreaktive 2'-desoxynucleosidanaloga.

Der Quervernetzungsmechanismus zwischen Aminosäure und 5-Halogenuracil ist eingehend untersucht worden. Wird der Chromophor 5-IodU durch UV-Licht einer Wellenlänge von 300 bis 350 nm angeregt, kommt es zur homolytischen Spaltung der C-I-Bindung. Die verbleibende Base besitzt ein radikalisches Elektron, welches zur Reaktion mit in der Nähe positionierten Aminosäuren befähigt ist. Hierbei werden die aromatischen Aminosäuren bevorzugt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abb. 1-4 dargestellt.

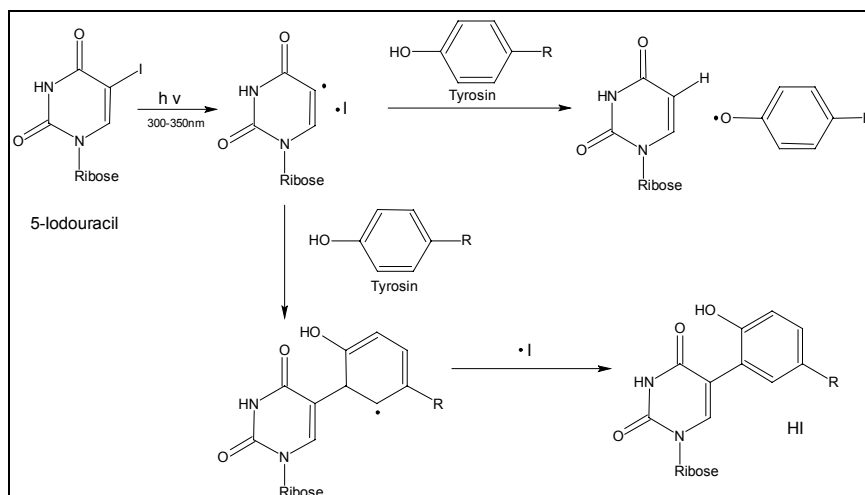


Abb. 1-4 Mechanismus der Photoquervernetzung mit 5-Iod-2'-desoxyuridin (5-IodU). Homolytische Spaltung der Iod-Kohlenstoff-Bindung führt zu einem Nucleobase-Radikal, welches mit aromatischen Aminosäureresten reagiert. Nach (Norris *et al.* 1996).

Der Einsatz von UV-Lasern statt UV-Handlampen oder Transilluminatoren hat einen Durchbruch in der Photochemie geschaffen (Moss *et al.* 1997). UV-Laser wurden nicht nur für die Bestrahlung von unmodifizierten DNA-Protein-Proben (Angelov *et al.* 1988; Hung *et al.* 1996), sondern auch für die Erzeugung der Proteinkomplexe mit substituierter DNA benutzt.

Teilweise waren in diesen Experimenten besonders hohe Quervernetzungsausbeuten von 75–95 % beobachtet (Holz *et al.* 1999; Meisenheimer & Koch 1997).

1.3. Biosensoren und ihre Anwendung für die Untersuchung der Reaktionskinetik

Für die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten für Protein-DNA-Interaktionen steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Allerdings arbeiten viele dieser Methoden (z. B. EMSA, Nitrozellulose-Filtration) nicht unter echten Gleichgewichtsbedingungen, sondern liefern nur apparente Gleichgewichtskonstanten und erlauben keine Aussagen über die Bindungskinetik. Zu den echten, in Lösung anwendbaren Gleichgewichtsmethoden gehören Fluoreszenzverfahren und isotherme Kalorimetrie. Die Messung der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), die erst in den letzten Jahren entwickelt wurde, hat mittlerweile eine breite Anwendung zur Bestimmung von Bindungskonstanten und zur Messung von Reaktionskinetiken gefunden. Als Oberflächenplasmonen bezeichnet man frei oszillierende Elektronen in einem Metall. SPR (surface plasmon resonance) ist ein optisches Phänomen, das durch eine Totalreflektion des Lichtes an der Metallfilm-Flüssigkeitsoberfläche verursacht wird. Wenn ein Lichtstrahl an die Grenzfläche zweier unterschiedlich dichter Medien (z. B. Glass und Wasser) trifft, wird er zum Teil reflektiert und zum Teil refraktiert. Für einen Strahl, dessen Einfallswinkel größer ist als der kritische Winkel Θ_k , tritt keine Brechung mehr auf, sondern erfolgt eine totale Reflektion. Ein Teil des totalreflektierten Wellenvektors (evaneszierende Welle) dringt durch die Oberfläche des optischen Mediums mit einer elektrischen Feldstärke ein, die mit zunehmender Eindringtiefe exponentiell absinkt. Bei einem monochromatischen, polarisierten Licht und einem Metallfilm an der Grenzfläche der Medien kann die evaneszierende Welle zu einer Anregung der Plasmonen in der Metallschicht führen. Für eine Oberflächenplasmonenresonanz muss der Wellenvektor k_x des einfallenden Lichtes mit dem Wellenvektor der Plasmonen k_x^{pl} übereinstimmen. Nur bei einem bestimmten Winkel wird die Energie des einfallenden Lichtes für die Anregung der Plasmonen verbraucht und damit die Intensität des reflektierten Lichtes gesenkt. Man spricht von einer „unterdrückten Totalreflektion“ (ATR – attenuated total reflexion). Durch eine Optimierung der Schichtdicke des Metallfilms – diese beträgt für Silber 53 nm, für Gold 49 nm – lässt sich eine vollständige Auslöschung der Intensität des vom Prisma reflektierten Lichtes erreichen. Auf diesem SPR-Messprinzip basiert das in der Arbeit verwendete Gerät BiacoreX, das aus einem Diodenlaser, SPR-Detektor und einer „Mikro-Fluss-System“ (Integrated μ -Fluidic Cartridge) besteht (Abb. 1-5).

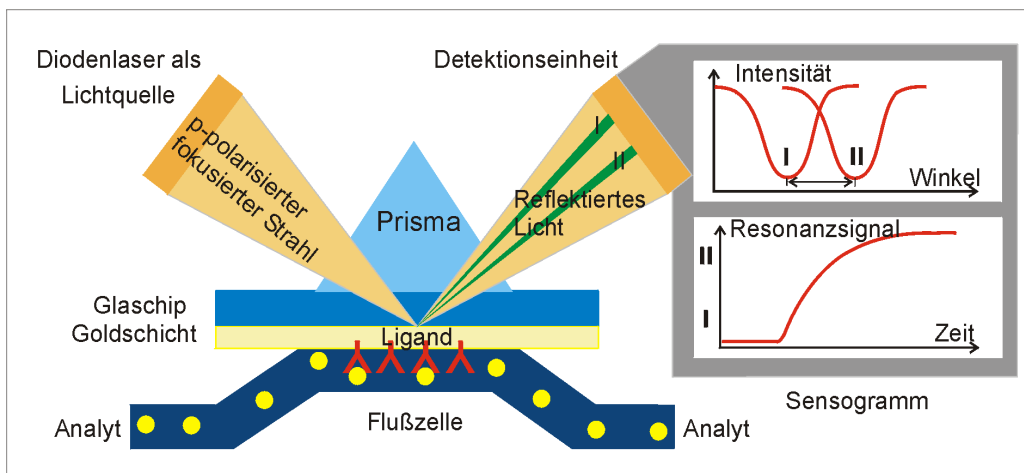


Abb. 1-5 Aufbau der optischen Meßeinheit des BiacoreX-Gerätes. Der Ligand wird über funktionelle Gruppen an die dementsprechend bearbeitete Chipoberfläche immobilisiert. Änderungen an der Chipoberfläche sind direkt mit der resonanten Anregung der Elektronen in der Metallschicht verbunden. Änderung des gemessenen Winkels des Intensitätsminimum (I und II) im reflektierten Licht wird als eine zeitabhängige Resonanzsignalkurve grafisch dargestellt (nach Pharmacia Biosensor AB, Uppsala/Sweden).

Das polarisierte Laserlicht wird über ein Prisma auf einen goldbeschichteten Sensorchip fokussiert. Die Goldoberfläche ist mit einer Monoschicht von Hydroxyalkyl-Thiol und einer daran gekoppelten 100 nm dicken Carboxymethyl-Dextranschicht bedeckt. An das aktivierte Dextran kann ein Bindungspartner (Ligand) über funktionelle Gruppen direkt oder z. B. über immobilisiertes Streptavidin gekoppelt sein. Bis zu 300 nm vom Metall entfernt stattfindende Änderungen des Brechungsindex aufgrund von Zugabe des zweiten Interaktionspartners (Analyt), Pufferaustausch etc., sind direkt mit der resonanten Anregung der Elektronen in der Metallschicht verbunden. Die Brechungsindexänderung führt dazu, dass die Oberflächenplasmonen unter einem anderen Winkel angeregt werden, wodurch sich das Intensitätsminimum im reflektierten Licht verschiebt. Diese Verschiebung wird als zeitabhängige Resonanzsignalkurve (Sensogramm) grafisch dargestellt (nach (Hall 2001; O'Shannessy *et al.* 1993), BIAcore-Bedienungsanleitung).

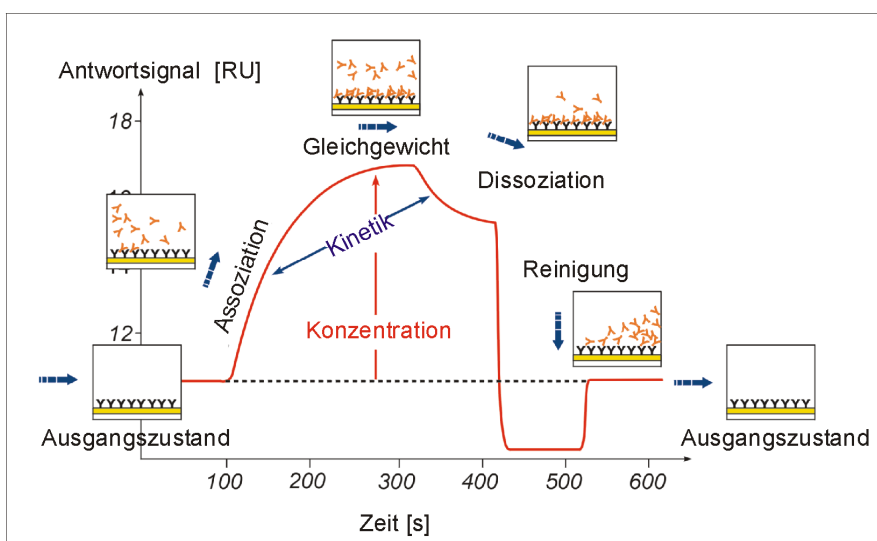


Abb. 1-6 Darstellung eines Sensogrammes. Ausgangszustand bezeichnet mit Ligand beladene Chipoberfläche; Signalthöhe und das Erreichen des Gleichgewichtszustandes ist Analytkonzentration abhängig; während des Reinigungsschrittes eluieren die nicht dissoziierten Analytmoleküle von der Chipoberfläche (nach Pharmacia Biosensor AB, Uppsala/Sweden).

Eine Sensogramm (Abb. 1-6) beinhaltet nach der Injektion des Analyten eine Assoziationsphase, die zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes führt. Nach der Injektionsende wird

die Dissoziation des Analyten von der Oberfläche beobachtet. Falls die Bindung zwischen dem Liganden und Analyten sehr stark ist, kann die vollständige Dissoziation des Analyten bis zu einigen Tagen dauern. In diesem Fall wird die Messung durch Injektion einer Regenerationslösung abgebrochen. Für eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden in der Regel mindestens sechs Sensogramme bei verschiedenen Analytkonzentrationen aufgenommen.

Die SPR-Messung findet die Anwendung in zwei großen Bereichen: „*Ligand fishing*“ mit anschließender MS-Analyse (Sonksen *et al.* 1998) und Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Biomolekülen wie Bestimmung der Reaktionskinetik und der thermodynamischen Parameter (K. Herlihy 2002). Der Vorteil des Verfahrens ist, dass eine qualitative und quantitative Analyse (in einem K_D -Bereich von 1 mM bis 1 pM) ohne zusätzlicher Markierung der Interaktionspartner für ein breites Spektrum biologischer Systeme durchführbar ist. Kleine Moleküle (<200 Da) (Leatherbarrow & Edwards 1999), Peptide, Proteine, Lipide, Oligonukleotide (Asensio *et al.* 1998) und Oligosaccharide (Haseley *et al.* 1999) können ebenso untersucht werden wie Phagen, virale Partikeln oder Zellen (Quinn *et al.* 2000; Rich & Myszka 2001; Rouet-Benzineb *et al.* 2000).

Aufgrund der hohen Sensitivität des Messsystems spielen die physikalischen Parameter eine wesentliche Rolle bei der SPR-Messung. Vor allem bei hochaffinen Protein-DNA-Komplexen ist es von großer Bedeutung, die experimentellen Bedingungen wie Flussgeschwindigkeit, Temperatur, Salzkonzentration und Chipbeladungsgrad (Edwards *et al.* 1997) zu optimieren, um unspezifische Wechselwirkungen bzw. diffusionskontrollierte Reaktionen (Mason *et al.* 1999) zu vermeiden (Leatherbarrow & Edwards 1999; Schuck & Minton 1996). Trotz der hochreproduzierbaren Messungen und optimierten Bindungsbedingungen gelingt es nicht immer, die Geschwindigkeitskonstanten nach einem theoretisch berechneten Modell zu bestimmen, wie dies z. B. für die NF- κ B p50-DNA-Bindung der Fall war (Michalopoulos & Hay 1999).

Für die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen mit Biacore stehen verschiedene Immobilisierungsmöglichkeiten der Bindungspartner zur Auswahl. Eine chemische Proteinkopplung an der Oberfläche ist oft mit Konformationsänderungen bzw. Proteininaktivierung verbunden. Eine Verwendung von GST-Fusions-, oder biotinylierten Proteinen ist zwar möglich, liefert aber ein schwaches Signal nach der Zugabe der kleinen Oligonukleotide. His-Tag tragende Proteine diffundieren in der Regel von der Ni-NTA-Oberfläche während der Messung und sind eher für niedrigaffine Protein-Protein-Interaktionen einsetzbar. Bei der Untersuchung von Protein-DNA-Bindungsreaktion bevorzugt man in der Regel eine DNA-Immobilisierung an der Chipoberfläche. Am häufigsten setzt man biotinylierte bzw. mit einer Thiolgruppe markierte Oligonukleotide in die SPR-Messungen ein (Michalopoulos & Hay 1999).

SPR-Analyse der Protein-DNA-Wechselwirkung beschränkt sich nicht nur auf die Messung der Reaktionskinetik und Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion. Durch

die DNA-Immobilisierung an der Oberfläche erhält man ein stabiles Messsystem zum Überprüfen der Proteinmutanten auf die Bindungspotenzial mit dem DNA-Fragment (Neylon *et al.* 2000; Suh *et al.* 1998) sowie zur Identifizierung der Proteindomäne, die eine Wechselwirkung mit immobilisiertem Liganden aufweisen (Yamamoto *et al.* 1997). SPR-Messung wird ebenfalls für die Charakterisierung der funktionellen Antikörper, die an das DNA-Ligand binden eingesetzt (Morioka *et al.* 2000). Durch die Injektion von Kernextrakt wurden Proteine, die an das immobilisierte Oligonukleotid binden, nicht nur kinetisch charakterisiert, sondern auch eluiert und in weiteren Verfahren (SDS-PAGE, Western-Blotting und EMSA) identifiziert (Galio *et al.* 1999). Das SPR-Verfahren ermöglicht eine schnelle Bindungsanalyse unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Die Untersuchung des Einflusses von NaCl- bzw. KCl-Konzentration auf die spezifische Protein-DNA-Wechselwirkung ist in mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt worden (Hart *et al.* 1999; Neylon *et al.* 2000). Auf dieser Art und Weise ist es möglich, auch den Einfluss von anderen Metallionen (z. B. Mg^{2+}) auf die Bindungsreaktion zu vermessen (Pond *et al.* 1997). Durchführung der Protein-DNA-Bindungsreaktion bei unterschiedlichen Temperaturen und Berechnung der Gleichgewichtskonstanten erlaubt eine Bestimmung der thermodynamischen Parametern der Reaktion (Änderung der Wärmekapazität ΔC_p , Gibbs-Energie ΔG , Enthalpie ΔH und Entropie ΔS) (Myszka 2000; Seimiya & Kurosawa 1996). Es ist denkbar, ein *Screening* der Kofaktoren, die die DNA-Protein-Bindungsreaktion beeinflussen, mittels SPR-Messung zu identifizieren und charakterisieren (Sawada and Suzuki 2000). Aus dieser Sicht bietet das SPR-Verfahren eine Vielfalt von Möglichkeit für die Untersuchung der Protein-DNA-Wechselwirkung.

1.4. *In vitro* Selektion funktioneller Protein- und Nukleinsäuremoleküle

1.4.1. Grundlagen und Anwendungen

Die *in vitro* Selektion von Proteinen und Nukleinsäuren hat als Verfahren zur raschen Identifizierung von spezifisch an einen Analyt bindenden Molekülen eine breite Anwendung gefunden. Mit diesem Ansatz konnten darüber hinaus neue Nukleinsäuren, Peptide oder Proteine mit bisher noch nicht bekannter Funktion oder Eigenschaften (wie z. B. molekulare Mimikry, Katalyse durch DNA-Enzyme (Roberts & Ja 1999)) aus einer Molekülbibliothek gewonnen werden.

Die SELEX-Methode (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential enrichments, (Tuerk & Gold 1990)) basiert auf einer wiederholten Anwendung des Prinzips der Selektion und Amplifikation von Proteine oder Nukleinsäuren einer gewünschten Funktionalität. Das Prinzip der Nukleinsäureselektion ist in der Abb. 1-7 dargestellt. Ein großer DNA-Pool, der typischerweise 10^{13} bis 10^{15} verschiedene chemisch synthetisierte Moleküle umfasst, wird

durch *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase in eine Bibliothek von RNA-Molekülen umgeschrieben. Der DNA-/RNA-Pool wird dann für eine gewünschte Eigenschaft selektiert, wobei DNAs bzw. RNAs, die diese Eigenschaft besitzen, z. B. mittels Affinitätschromatographie, Protein-Nukleinsäure Bindung an Nitrozellulose-Filter oder Gelelektrophorese isoliert werden (Kopylov & Spiridonova 2000). Die so selektierten Moleküle werden als Aptamere bezeichnet. Da nur ein kleiner Bruchteil der in der Anfangsbibliothek enthaltenen Varianten die gewünschte spezifische Eigenschaft besitzt, sind mehrere Selektionszyklen nötig, um einen mit bestimmten Spezies angereicherten Pool zu erhalten. Daher wird der RNA-Pool nach jedem Selektionsschritt durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und die DNA-Moleküle werden mittels PCR amplifiziert. Zur Vergrößerung der Variabilität des DNA-Pools kann die PCR unter Bedingungen erhöhter Mutationsrate (z. B. durch Zugabe von Mn^{2+}) durchgeführt werden (Li *et al.* 2000). Um den Endpunkt der Selektion und die Variabilität des Pools zu bestimmen, wird entweder eine DNA-Sequenzierung nach verschiedenen Selektionsrunden durchgeführt oder die DNA-Renaturierungsrate quantifiziert bzw. die Aktivität des Pools gemessen (Charlton & Smith 1999). Meist werden die DNA-Moleküle nach 5–10 SELEX-Zyklen kloniert und sequenziert. Über einen Sequenzvergleich können gemeinsame Motive identifiziert und die funktionellen und strukturellen Eigenschaften einzelner klonierten Moleküle untersucht werden. Über einen Konsensusmotiv-Vergleich und eine phylogenetische Sequenzanalyse ist es möglich, Vorhersagen zur Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der selektierten Moleküle zu treffen.

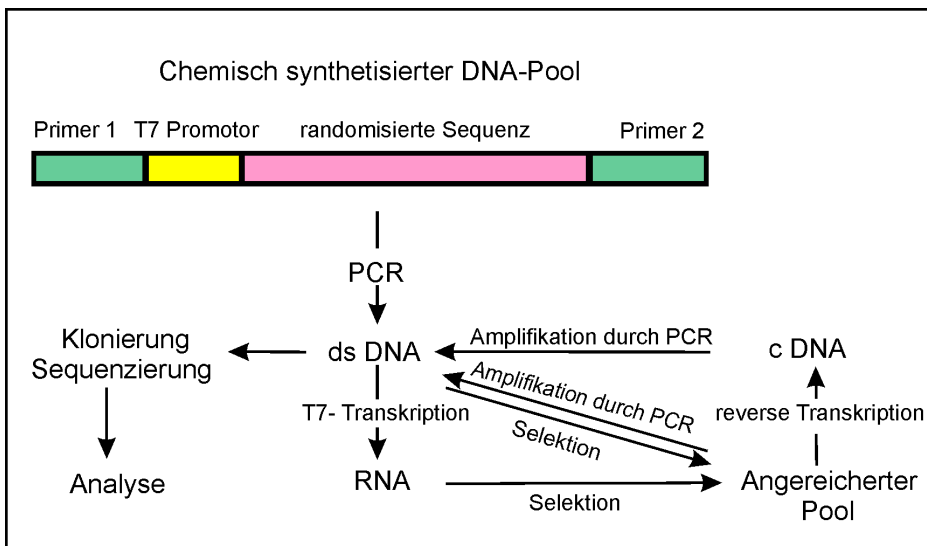


Abb. 1-7: Selektion funktioneller DNA-, RNA-Moleküle *in vitro* (SELEX). Aus einem Nukleinsäure-Pool können DNA- oder RNA-Moleküle mit einer gewünschten Eigenschaft durch wiederholte Selektions- und Amplifikationszyklen isoliert werden.

Eine Erweiterung des SELEX-Verfahrens zur Identifizierung Nukleinsäure-bindender Proteine hat Golden *et al.* etabliert. Dabei wird eine Photo Selektion verwendet, bei der die Aptamere BrdU enthalten und über UV-Bestrahlung kovalent mit einem Protein verknüpft werden (Golden *et al.* 2000).

Die meisten Selektionsverfahren werden in zellfreien Systemen durchgeführt. Der Bedarf, Aptamere unter nativen Bedingungen zu selektieren, führte zur Entwicklung von neuen Selektionsmethoden. Cooper hat eine RNA-Selektion in Wirbeltier-Zellen etabliert, um Exon-

Sequenzen, die Exon-*Splicing* inhibieren, zu isolieren. Dabei wurden die Exon-Sequenzen in ein Minigen ligiert und die gesamte mRNA wurde nach der Zelltransfektion isoliert. Während der RT-PCR konnten nur das Exon enthaltende Moleküle amplifiziert werden. Dieser Methode macht es ebenfalls möglich, Protein-spezifische Exon-Sequenzen zu isolieren und zu untersuchen (Cooper 1999). Das *in vivo* SELEX-Verfahren mit den an der Phagenoberfläche exponierten Aptameren fand eine breite Anwendung in der Peptid- bzw. Protein-Selektion auch aufgrund der Vermehrung des Ausgangsmaterials *in vivo* (Kay *et al.* 2001). Mit dem Ziel, die Selektion *in vitro* so nah wie möglich an die Situation *in vivo* für die DNA-Selektion anzupassen, wurden randomisierte DNA-Pools aus genomischer *Arabidopsis*, *E. coli*, Hefe und humaner DNA konstruiert (Gold *et al.* 1997) und für die DNA-Selektion mit spezifisch-bindenden Proteinen eingesetzt (Singer *et al.* 1997).

Die schrittweise durchgeführten Selektionsverfahren enthalten verschiedene Nachteile wie den Eingriff des Experimentators in die Selektionsreaktion, eine selektive Amplifikation nur bestimmter Varianten sowie einen Hintergrund von inaktiven mitselektierten Molekülen, Verluste des Ausgangsmaterials bei jedem Reinigungsschritt und ein dadurch entstehender Zeitaufwand. Um dies zu umgehen, haben Wright & Joyce eine "ununterbrochene *in vitro* Evolutions-Strategie" für autokatalytische Aptamere etabliert (Wilson & Szostak 1999; Wright & Joyce 1997). Das Verfahren erlaubt eine exponentielle Vermehrung der aktiven RNA-Aptamere in sehr kurzer Zeit (100 Transferrunden in 52 Stunden). Die kontinuierliche Evolution, die zur Zeit nur begrenzt einsetzbar ist, stellt ein realistisches Model der biologischen Evolution *in vitro* mit einem minimalen Eingriff von Experimentator und niedrigem Zeitaufwand vor.

Da die Protein- oder Ligandbindung an die DNA meist auf die Bindung an die B-DNA zu führen und relativ leicht zu untersuchen ist, fand die DNA-Selektion in der SELEX-Entwicklungsphase keine vielfältige Anwendung. Vergleichbar mit RNA-*tetra*loops oder -*bulge*-loops können auch einzelsträngige DNA-Moleküle katalytisch aktive Sekundär- oder Tertiärstrukturen bilden (Breaker 1997), wobei neben den A:T, G:C Basenpaaren auch Nicht-Watson-Crick Basenpaarungen bzw. Basenstapelungen sowie Pseudoknoten, „*kissing*“-Komplexe, parallele oder antiparallele Triplexen und Guanin-Quadruplexen vorkommen können (Gilbert & Feigon 1999; Li & Breaker 1999).

Mit der Entdeckung von DNA-Enzymen ist das Interesse an DNA-SELEX-Verfahren und DNA-Katalysatoren geweckt worden. Obwohl DNA-Enzyme *in vivo* nicht bekannt sind, konnten katalytische DNA-Moleküle mittels Selektion *in vitro* isoliert werden, die dieselben Reaktionen wie in der Natur vorkommende Ribozyme katalysieren. Im Gegensatz zu RNA sind die ssDNA-Aptamere stabiler und leichter handhabbar, was die Untersuchung katalytischer DNA-Eigenschaften auch unter extremer Temperatur oder hohem pH-Wert ermöglicht (Li & Breaker 1999). In der Tabelle 1-1 sind einige bekannten Reaktionen, in denen RNA- und DNA-Enzyme als Katalysatoren wirken, zusammengestellt.

Tabelle 1-1: Katalyse durch RNA- und DNA-Enzyme (Joyce 1998). Unter natürlichen Ribozymen versteht man Derivate der katalytischen, biologischen RNA, künstliche Enzyme bezeichnen während der Selektion *in vitro* erzeugte Moleküle.

Reaktion	RNA-Enzyme		DNA-Enzyme
	natürliche	künstliche	künstliche
Phosphoester-Transfer	+	+	
Phosphoester-Hydrolyse	+	+	+
Ligation von Polynukleotiden		+	+
Autophosphorylierung		+	+
Knüpfung einer Peptidbindung	+	+	
Metallbindung in Porphyrine		+	+
Aminoacyl-Transfer		+	
Oxidative DNA Spaltung			+

1.4.2. Selektionsexperimente *in vitro* für die Charakterisierung von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen

SELEX-Verfahren erlaubt die Detektion, Untersuchung und Charakterisierung vieler verschiedenen Funktionen von Nukleinsäuren. Neben der katalytischen Aktivität von DNA's oder RNA's kann deren spezifische Bindung an Proteine mit Hilfe der *in vitro* Selektion untersucht werden. Während der Selektion ist die Entdeckung neuer Nukleinsäuren möglich, die in die Therapie und Diagnose eingesetzt werden. Viele SELEX-Untersuchungen konzentrieren sich auf spezifische Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung, wobei – neben bereits bekannten und funktionell charakterisierten Protein-Nukleinsäure-Interaktionen (Cui *et al.* 1995; Emmerich *et al.* 2000) – auch eine Nukleinsäurebindung für solche Proteine in den Selektionsverfahren gefunden werden konnte, für die *in vivo* keine Nukleinsäurebindung bekannt ist. In diesem Fall enthalten die Proteine häufig eine Polyanionen-Bindungstasche. Für Proteine mit bereits bekannter Nukleinsäurebindung konnten mit SELEX-Verfahren solche Aptamere gefunden werden, die mit höherer Affinität – K_d -Wert in pikomolarem Bereich – als die natürliche zugehörige Nukleinsäure gebunden werden. Für Proteine ohne bekannter Nukleinsäurebindung konnten *in vitro* Aptamere mit nanomolarer Affinität selektiert werden. Ein Beispiel dafür sind RNA-Aptamere, die mit Heparinbindenden-Wachstumsfaktoren eine starke Wechselwirkung aufweisen. Dies spricht für die mögliche therapeutische Anwendung solcher Aptamere (Gold *et al.* 1997). Analyse der Protein-DNA-Wechselwirkung mittels DNA-SELEX erlaubt in der Regel eine Bestimmung des konservierten Protein-Bindungsmotivs in selektierter DNA (Tsai & Reed 1998). Identifizierte Aptamere sind andererseits nicht immer hochkonservativ und mit den im Genom vorkommenden Sequenzen vergleichbar (Frank 1999).

Eines der am besten untersuchten DNA-Aptamere ist eine aus 15 Basen bestehende ssDNA-Sequenz, die strukturspezifisch mit Trombin wechselwirkt und dadurch die Konver-

sion von Fibrinogen in Fibrin verhindert. Diese Aptamere zeichnen sich durch eine kompakte, hoch symmetrische ssDNA-Struktur aus, die aus zwei G-Tetraden und drei Loops besteht (Klug & Famulok 1994; Kopylov & Spiridonova 2000; Tasset *et al.* 1997).

Zur Charakterisierung der Anti-DNA-Antikörper wurde ebenfalls DNA-Selektionsverfahren eingesetzt. Nach der Immunisierung mit pBR322 Plasmid-DNA produzierte Antikörper wurden in die Immunopräzipitationsexperimente mit variablem ssDNA- und dsDNA-Pool eingesetzt. Erstaunlicherweise binden die gleichen Antikörper spezifisch an unterschiedliche DNA-Motive. Die ssDNA wird an CACC-, CCCC- und ACCC-Erkennungsmotive gebunden, im Gegensatz zu dsDNA, die an GCG- bzw. TGCG-Motiven erkannt wird (Wang *et al.* 2000).

Proteine bzw. Peptide haben eine große Strukturvariabilität während der Erkennung und Bindung an einer Nukleinsäure aufgezeigt. Ein 17-mer Peptid, das aus dem HIV-1 Rev-Protein abgeleitet ist, nimmt während der RNA-Bindung eine aptamerspezifische, α -helikale Struktur an, während es in Lösung unstrukturiert vorliegt (Hermann & Patel 2000; Hermann & Westhof 1999). Auf diese Weise ist es denkbar, neue Pharmazeutika auf Basis der bestimmten RNA- bzw. DNA-Moleküle herzustellen. Das SELEX-Verfahren wird nicht nur für die Charakterisierung von Erkennungsmotive eingesetzt, sondern auch zur Gewinnung von Oligonukleotiden, die als Inhibitoren der physiologischen Prozesse wirken (Wilson & Szostak 1999).

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae* – ABF1 (**A**utonomously **R**eplicating **S**equences (**ARS**) **B**inding **F**actor 1) – ist ein multifunktionelles Protein, dessen Rolle bei Transkription und DNA-Replikation noch weitgehend ungeklärt ist. Es liegen nur wenige strukturelle Informationen zu ABF1 vor und auch die Wechselwirkung mit der zugehörigen DNA-Sequenz ist nur ansatzweise charakterisiert. Ziel dieser Arbeit ist, die Wechselwirkung von ABF1 mit DNA näher zu beschreiben, um dadurch ein besseres Verständnis der ABF1-Funktion zu erlangen. Im Einzelnen sollten folgende Punkte experimentell bearbeitet werden:

- Analyse der ABF1-Bindungsaffinität für DNA und Vergleich der apparenten Gleichgewichtskonstanten von ausgewählten ARS's und Sequenzen aus Promotorregionen. Dabei sollte auch der Einfluss einer Methylierung in der Erkennungssequenz untersucht werden.
- Nähere Charakterisierung der in der Literatur beschriebenen ABF1-Konsensusmotivs 5'-RTCRYNNNNACG-3' und Suche nach neuen hochaffinen ABF1-Bindungsmotiven. Dafür sollte ein DNA-Selektionsverfahren *in vitro* (SELEX) verwendet werden.
- Bestimmung der Kinetik und Thermodynamik der ABF1-DNA-Bindung mittels Oberflächenplasmonenresonanzmessung (SPR).
- Identifizierung von Kontaktpunkten im ABF1-DNA-Komplex mit Hilfe der Photoquervernetzung. Es sollte ein kovalent quervernetzter ABF1-ARS1-Komplex hergestellt und isoliert werden. Nach Proteolyse des Protein-DNA-Adduktes sollte die Position der quervernetzten Aminosäure mit Hilfe einer Proteinsequenzierung bzw. MALDI-MS-Analyse bestimmt werden.

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Reagenzien

2.1.1. Allgemeine Chemikalien

LMP-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Agar, Hefeextrakt, Bactopecton, X-Gal, IPTG, DTT, Tris, EDTA, Ethidiumbromid, Agarose, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
APS, TEMED, Nonidet-P40	Merck, Darmstadt
Ampicillin, PMSF	Gerbu, Gaiberg
HEPES, MOPS, Coomassie Brillantblau G, poly[dl-dC], E-64	Sigma, München
dNTPs, ATP	Boehringer, Mannheim; Fermentas, St.Leon-Rot

Alle andere Chemikalien stammten von den Firmen Boehringer, Fluka, Gibco, Merck, Pharmacia, Roth, Serva, Sigma und hatten p.a.-Qualität.

2.1.2. Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (3000Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5000Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig

2.1.3. Proteine und Enzyme

BSA, T4 Polynukleotidkinase	NEB, Schwalbach
Lysozym, Dnase I, Rnase A, alkalische Phosphatase I	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	
Restriktionsendonukleasen, Taq DNA-Polymerase, Vent DNA-Polymerase, T4 DNA-Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot
Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Amersham, Braunschweig
Taq Polymerase	PeqLab, Erlangen
Alkalische Phosphatase II, TLCK-Chymotrypsin, Trypsin, Leupeptin, Pepstatin A	Sigma, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitoren-Tabletten: "Complete TM Mix EDTA free protease inhibitor"	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Fluka, Neu-Ulm

2.1.4. Chromatographiematerialien

Ni ²⁺ -NTA-Agarose/-Superflow	Qiagen, Hilden
dsDNA-Cellulose	N. Dank, Bayreuth
Sephadex G25, SP-Sepharose, Q-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Fractogel EMD DEAE 650S	Merck, Darmstadt

2.1.5. DNA- und Proteinstandards

10 bp, 1 kbp, 100 bp DNA-Standard	Fermentas, St.Leon-Rot	
LMW, HMW Proteinstandard	Pharmacia, Freiburg	
SDS-PAGE Standard (prestained)	NEB, Schwalbach	
gf5 (Standard für Gelfiltration)	Je 2 mg/ml Thyreoglobulin (670 kDa – V _O), β-Amylase (200 kDa), ADH (150 kDa), BSA (67 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), 0,1 g/l PABA (V _T)	G. Lipps, Bayreuth
gf7 (Standard für Gelfiltration)	Je 1 mg/ml Thyreoglobulin (670 kDa – V _O), β-Amylase (200 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Ribonuklease (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa), 0,1 g/l PABA (V _T)	G. Lipps, Bayreuth
PMW Peptidstandard	Lysozym (14,6 kDa), Aprotinin (6,5 kDa), Insulin (5,77 kDa: 3,5 kDa + 2,2 kDa), Bacitracin (1,422 kDa)	T. Hey, Bayreuth

2.2. Bakterienstämme und Plasmide

<i>E.coli</i> XL1Blue	<i>supE44 hsdR7 end1A rel1A gyrA96 thi Δ(lac-proAB)</i>	(Bullock <i>et al.</i> 1987)
pQE12-ABF1	Amp ^R , Cm ^R , P _{T5} Expressionsvektor für ABF1 mit C-terminalem His ₆ -Tag	N. Dank, 1997, Bayreuth
pUC19_SELEX	pUC19 Vektor enthält ein 26-60 bp PCR-Produkt nach 15. SELEX-Zyklus zwischen <i>EcoR1</i> und <i>HindIII</i> Schnittstellen	Diese Arbeit
pUC19	Amp ^R , lacZ'	Yanisch-Perron 1985
pQE12-ABF1_E3E7	Amp ^R , Cm ^R , P _{T5} Expressionsvektor für N-terminalen ABF1 (1–212 A.S.) mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE12-ABF1_E3E6	Amp ^R , Cm ^R , P _{T5} Expressionsvektor für N-terminalen ABF1 (1–234 A.S.) mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit

pQE12- ABF1_E3E5	Amp ^R , Cm ^R , P _{T5} Expressionsvektor für N-terminalen ABF1 (1–173 A.S.) mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE12- ABF1_E3E8	Amp ^R , Cm ^R , P _{T5} Expressionsvektor für N-terminalen ABF1 (1–537 A.S.) mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pGEM-T	Amp ^R , lacZ', linearisierter Vektor	Promega, Mannheim

2.3. Oligodesoxyribonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von kommerziellen Anbietern (Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg; Interactiva, Ulm; EUROGENTEC, Seraing/Belgien) erworben. Die Zahlen in Klammern verweisen auf Anfangs- und Endpositionen (in 5' → 3' Richtung) der analysierten Oligonukleotide im gesamten Bereich des *abf1*-Gens, bzw. der ARS-Elemente oder Promotorsequenzen. Unmodifizierte Gegenstränge der Oligonukleotiden sind nicht dargestellt.

- Sequenzierprimer

UP+G	5' -GTAAAACGACGGCCAGT
M13-reverse Sequenzier Primer	5' -GTAAAACGACGGCCAGTGCCA
T7 Promotor	5' -TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG
11422 (für pQE-Vektor)	5' -AGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG
pQE-rev (= 11522) (für pQE-Vektor)	5' -GTTCTGAGGTCATTACTGGATCT
pUC19/404	5' -GCTCGGTACCCGGGATCCTC
5'-pGEX-seq	5' -GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
3'-pGEX-seq	5' -CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG

- Oligonukleotide und DNA-Pools für SELEX-Experiment

Die eingeführten *Hind*III- bzw. *Eco*RI-Schnittstellen sind unterstrichen, N = A, G, C oder T. Die DNA-Pools wurden freundlicherweise von AG Sprinzl zur Verfügung gestellt.

Sel-Pool (N = 50)	5' -GCGA <u>ATTCT</u> TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGA TACTACACGTG–N ₅₀ –CGGA <u>AGCTTCT</u> GCTACATGCAATGG
p25 (<i>Hind</i> III Schnittstelle)	5' -CGGA <u>AGCTTCT</u> GCTACATGCAATGG
p28 (<i>Eco</i> RI Schnittstelle)	5' -GCGA <u>ATTCT</u> CGGAGAGGATACTACACGTG
Sel-Pool (N = 30)	5' -GGGCAGTGA <u>ATTCT</u> CAG–N ₃₀ –GCA <u>AGCTTGG</u> ACGTG
pSel1 (<i>Eco</i> RI Schnittstelle)	5' -GACCCGTAGGGCAGTGA <u>ATTCT</u> CAG
pSel2 (<i>Hind</i> III Schnittstelle)	5' -GCGACACACGTCCA <u>AGCTT</u> GC
pSel1_rev	5' -CTGA <u>ATTCT</u> ACTGCCCTACGGGTC

- PCR-Primer für Synthese der ARS-Elementen

ARS-Primer entsprechen der ARS1-Sequenz aus *S. cerevisiae*.

Bezeichnung	Sequenz	Pos. ARS1
PCR-A	5' - AGAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTG	(704-727)
PCR-T	5' - TTCCTGTACAATCAATCAAAAAGCCAAATG	(934-903)
ext4	5' - AATAACCTATTTCTTAGCATTTTTGACG	(786-759)
ext3	5' - CTTTTATGCTTGCTTTTCAAAGGCC	(856-821)
ext2	5' - TACTTAAATAAATACTACTCAGT	(787-809)
ext1	5' - CCTGCAGGCAAGTGCACAAACAATAC	(822-807)

- Oligonukleotide für Konstruktion eines ABF1-Expressionsgenes

Die eingeführten *Bam*HI Schnittstellen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz	Pos. <i>abf1</i>
E-4	5' - CGCGGATCCTTGACCTCTTAATTCTGGTTG	(2172-2193)
E-3	5' - CGGGGATCCGACAAATTAGTCGTGAATTAT	(4-24)
E-5	5' - CGGGGATCCGTTGTTGGCATCAGCATCATC	(528-508)
E-6	5' - CGGGGATCCTACGTCAGAATAGTTTTTCGT	(711-691)
E-7	5' - GTGGGATCCGCTGTCATTACCATGAGTAGG	(645-625)
E-8	5' - CAGGGATCCCTTGCTCCATTTATTGACGCT	(1611-1591)
E-8_neu	5' - CGGGGATCCCTTGCTCCATTTATTGACGCTTGG	(1611-1587)

- Oligonukleotide für Quervernetzungsexperimente mit ABF1

Eingeführte IdU-Modifikationen („I“) sind fett markiert. Das Konsensus-Erkennungsmotiv für ABF-1 (5'-RTCRYNNNNACG, (Halfter *et al.* 1989b)) ist unterstrichen und bei den ersten vier Oligonukleotiden entspricht der Bereich zwischen 748–774, bzw. 748–778 (XL-13) Basen im ARS1-Element. Bezeichnung „rev“ steht für den jeweiligen Gegenstrang.

XL-13	5' - GCAA II ICG I CI II IAAIG AI IAGAAATAGG
XL-15_8	5' - GCAAATT I CGTCAAAAATGATAAGAAA
ABF1-R21_I = XL15_21	5' - GCAAATTT I CGTCAAAAATG AI IAAGAAA
XL15_8_21	5' - GCAAATT I CGTCAAAAATG AI IAAGAAA
ARS120_17_BI	5' - CAAGTG I CGTGCATAATGATGTGGGT
His7_a_18_rev	3' - TAATCGGCACCTCTCTCTCT II TTTATTA
His7_b_16	5' - ATTAG I CGTGGAGAGAGAGAAAAATAAT

- Modifizierte Oligonukleotide und PCR-Primer für Untersuchung der ABF1-DNA-Wechselwirkung

Für SPR-Messungen sind PCR-T, ARS121-1_rev, am 5'-; xl15_plus, xl15_bio_kontr, ARS120_17_bio am 3'-Ende mit Biotin markiert worden. Im Primer PCR-T wurde am 5'-Ende eine Thiolgruppe eingebracht.

Fett markierte Oligonukleotide wurden als Kontrolle für eine unspezifische ABF1-Bindung verwendet. Die mit „6“ markierte Base entspricht 5-Methyl-dC. *Kursiv* dargestellte Nukleotide entsprechen Abweichungen von einer *wild typ* Sequenz und wurden für die Bildung von dsDNA mit ungepaarten Nukleotiden in der ABF1-Erkennungssequenzmitte verwendet.

DNA	Bezeichnung	
ARS1	xl15_bio_kontr	5' -GCAAATTCATTGAAAGGTTGTAAGAAC
ARS1	xl15_plus	5' -GCAAATTTTCGTCAAAAATGATAAGAAAC
ARS1	xl15_plus_4g	5' -GCAAATTTTCGTCAAgAATGATAAGAAAC
ARS1	xl15_plus_3-4g	5' -GCAAATTTTCGTCAggAATGATAAGAAAC
ARS1	xl15_plus_3-4-5g	5' -GCAAATTTTCGTCAgggATGATAAGAAAC
ARS1	xl15_plus_4x_g	5' -GCAAATTTTCGTGggggATGATAAGAAAC
ARS1	xl15_plus_5x_g	5' -GCAAATTTTCGTGgggggTGATAAGAAAC
ARS1	abf-Ts_4c	5' -GTTTCTTATCATTCcTTGACGAAATTTGC
ARS1	abf-Ts_4-5c	5' -GTTTCTTATCATTCccTGACGAAATTTGC
ARS1	abf-Ts_3-4-5c	5' -GTTTCTTATCATCcccTGACGAAATTTGC
ARS1	abf-Ts_4x_c	5' -GTTTCTTATCATCccccGACGAAATTTGC
ARS1	abf-Ts_5x_c	5' -GTTTCTTATCAccccGACGAAATTTGC
ARS1	PCR-T	5' -TTCCTGTACAATCAATCAAAAAGCCAAATG
ARS1	xl15_met12	5' -GCAAATTTTCGT6AAAAATGATAAGAAA
ARS1	abf-Ts_met10	5' -GTTTCTTAT6ATTTTTGACGAAATTTGC
ARS1	xl15_met9	5' -GCAAATTT6GTCAAAAATGATAAGAAA
ARS1	abf-Ts_met19	5' -GTTTCTTATCATTTTTTGA6GAAATTTGC
ARS1	um_xl15_p	5' -CAAAGAATAGTAAAAACTGCTTTAAACG
ARS120	ars120_17_BI	5' -CAAGTGICGTGCATAATGATGTGGGT
ARS120	ars120_lang	5' -GCGCCAAGTGTTCGTGCATAATGATGTGGGTGCGG
ARS120	ars120_kurz	5' -CCGTGCATAATGAC
ARS120	ars120_unsp	5' -CTATGGATAATCCC
ARS120	ars120_17	5' -GTGTCGTGCATAATGAT
ARS120	ars120_20	5' -GTGTCGTGCATAATGATGTG
ARS121	ars121-1	5' -TTTCGTATTTAGTGATTATAATACTT
ARS121	ars121-2	5' -TGATACGTCTTTGTCATTATATACCCAAAGTTT
ARS1501	ars1501-1	5' -CAGAAAATCGTACAGTGTGATTTTCTTTTCG
ARS1501	ars1501-2	5' -CATATTTACGTATTTGCTGATGATTGTTGG

his7	his7_a_rev	5' -ATTAGCCGTGGAGAGAGAGAAAAATAAT
ded1	ded1_ABF	5' -CGCGCGGAGCAAGTCTTACTGTGCATATCTTACTACGTAAT
ded1	ded1_2	5' -TAATGCATCATTCTATACGTGTCATTCTGAACGAGGCGCGC
ded1	ded1_2_mut1	5' -TAATGCATCATTCTATACGTGTCATTCTGAATAAGGCGCGC
ded1	ded1_2_mut2	5' -TAATGCATCATTCTATATATGTCATTCTGAACGAGGCGCGC
rpo31	rpo31_2	5' -ATTATCATCACTATATACGTGAATATCGTGTTCACGAAAT
rpo31	rpo31	5' -TAAAGCACTTTGTGCTATAAGTGCATATATCACTACTATTA
ypt1	ypt1_2	5' -GCCTAGGTCACTGTACACGTATATCGTGACCCGGCGCCAAA

- Im SELEX-Verfahren bestimmte und analysierte Aptamere

Mit „15“ bezeichnete Oligonukleotide entsprechen DNA-Aptamere nach dem 15. SELEX-Zyklus. * – zum Aptamer 15-4-I_15 wurden 7 Nukleotide (*gcaagct*) aus der Primerregion zugegeben, um ein vollständiges ABF1-Erkennungsmotiv wiederherzustellen. I und II bezeichnen den ersten und zweiten SELEX-Komplex (s. Text).

15-I_2	5' -CACGGTGGATGCATATCATAATCACGGTAA
15-I_4	5' -TAGTGATGTTTCGTGGCGAATGATACACTTA
15-I_8	5' -TTGACATCATGTTATACGGTAGTACTGTGG
15-I_15+7*	5' -ACATGTGATGATATATCGTGTCTCGTGATAgcaagct
15-I_23	5' -CGTGTCGTATTGAGTGATATGATGCACATA
15-I_76	5' -ATCGATGACCCGTAgGCAGTGAATTACGT
15-I_86	5' -TGTATCGTATTTGGTGATGTTTGGTGTTCA
15-I_210	5' -TAACGTAGGGGATCGTCGTTAGTTACGTAT
15-II_17	5' -TCGGATGGAtCTGtCGTTTTGTACGTTTG
15-II_54	5' -GCTGATCGTATGGTGTGATGTCCATTGCA
15-II_130	5' -TCCTGGTCTCGTGGAAGATGATCCCTTCA
15-II_133	5' -ACATCACGTCCGGTAGTGATAGAGGTTCCA
15-II_141	5' -AGACACTGTCTGTATTGTTACCACGGCG
15-II_14	5' -AATAGGTGAGGTGTCGTTTCGTAGTATCAC

2.4. Nährmedien und Lösungen

Sämtliche Medien wurden vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert, hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert und später hinzugefügt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.

LB-Medium	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)
2x YT-Medium	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)
SOC-Medium	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)

- Puffer für native PAA- und Agarose-Gelelektrophorese

TAE	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)
TBE	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)
TBE (ABF1)	TBE Puffer mit 6 % Glycerin
Nativer Auftragspuffer (2x) D _n	40 % (w/v) Sucrose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA pH 8,0
Nativer Proteingel-Auftragspuffer P _n (5x)	125 mM Tris (pH 6,8), 24 % Glycerin, 4 % β-ME, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Nativer Proteingel-Puffer (PN)	25 mM Tris (pH 8,9), 190 mM Glycin, 10 mM EDTA

- Puffer für denaturierende PAGE

Denaturierender Auftragspuffer D _d (5x)	20 mM EDTA, 0,2 % (w/v) Xylencyanol, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau in Formamid
Schägger-Jagow Auftragspuffer (4x)	50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 12 % (v/v) Glycerin, 2 % (v/v) β-Merkaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Serva-Blue G
Laemmli-Auftragspuffer (4x)	50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 200 mM DTT, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Schägger-Jagow-Gelpuffer	0,3 M Tris/HCl (pH 8,45), 0,03 % (w/v) SDS
Schägger-Jagow-Kathodenlaufpuffer	0,1 M Tris/HCl (pH 8,25), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 M Tricin
Schägger-Jagow-Anodenlaufpuffer	0,2 M Tris/HCl (pH 8,9)
Laemmli-Sammelgelpuffer	0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS
Laemmli-Trenngelpuffer	0,375 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS
Laemmli-Laufpuffer	0,025 M Tris/HCl (pH 8,3), 0,1 % (w/v) SDS, 0,192 M Glycin

- Proteinfärbelösungen

Bradfordlösung	0,01 % (g/v) Coomassie Brilliant Blue, 4,7 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) Phosphorsäure
Amidoschwarz	0,1 % (g/v) Amidoschwarz 10B in Methanol/ Essigsäure/ Wasser (45/10/45, v/v/v)
Entfärbelösung I	90 % (v/v) Methanol 2 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung II	30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie	0,4 % (g/v) Coomassie Brilliant Blue, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

- Lösungen für *Semidry-Blotting*

Anodenlösung I	0,3 M Tris, 20 % (v/v) Methanol
Anodenlösung II	0,025 M Tris, 20 % (v/v) Methanol
Kathodenlösung	0,04 M 6-Aminohexansäure, 0,01 % SDS (g/v), 20 % (v/v) Methanol

- Protein-Dialysepuffer

Puffer H01	50 mM HEPES , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM (CH ₃ COO) ₂ Mg, 100 mM NaCl, 0,04 % Nonidet P40, 10 % Glycerin, (pH 7,5)
Puffer M01	50 mM MOPS, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,04 % Nonidet P40, 10 % Glycerin, 50 µM ZnCl ₂ , (pH 7,5)
Puffer H02	50 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,04 % Nonidet P40, 50 % Glycerin, (pH 7,5)

- Puffer für Chromatographie

HPLC-Gelfiltrationspuffer	0,1 M Na-Phosphat (pH 7,2), 0,1 M Na ₂ SO ₄
SP-Sepharose, Q-Sepharose	A: 50 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM MgCl ₂ , 5 % Glycerin B: (A) mit 1 M NaCl
dsDNA Zellulose	A: 50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM MgCl ₂ B: (A) mit 1 M NaCl
Ni ²⁺ -NTA	A: 50 mM Na-Phosphat (pH 8,0), 300 mM NaCl B: (A) mit 250 mM Imidazol
DEAE	A: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl B: (A) mit 1 M NaCl

- Bindungspuffer

B/O1	20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT
H005 bzw. M005	25 mM HEPES bzw. MOPS (pH 7,5), 50 mM NaCl, 2 mM β-ME, 25 µM ZnCl ₂
Biacore Puffer (HBS-EP)	10 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,005 % (v/v) Surfactant 20
H/0	50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 10 mM DTT
ref/18 nach (Eisenberg <i>et al.</i> 1988)	50 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
ref/41 nach (McBroom & Sadowski 1994)	35 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 120 mM K(OAc), 12 mM Mg(OAc) ₂ , 0,5 mM DTT
ref/201 nach (Della Seta <i>et al.</i> 1990b)	20 mM Tris-HCl (pH 7,3), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM CaCl ₂ , 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 7 % Glycerin

- Sonstiges

Diffusionspuffer für PAAG 0,5 M (NH₄)OAc (pH 8,0), 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM EDTA,
(Qiagen) 0,1 % SDS
TE (Sambrook *et al.* 1989)

2.5. Kommerzielle Kits

2.5.1. DNA Reinigungs- und Modifikationskits

„pGEM-T“ Klonierungskit	Promega, Mannheim
DNA-Reinigungskit „ <i>NucleoSpin for fast purification of nucleic acids</i> “	Macherey-Nagel, Düren
DNA-Extraktionskit „ <i>Nucleotrap extraction kit for nucleic acids</i> “	Macherey-Nagel, Düren
DNA-Extraktionskit „ <i>QIAEX II</i> “	QIAGEN, Hilden
DNA-Reinigungskit „ <i>QIAquick Spin</i> “	QIAGEN, Hilden
Plasmid-Reinigungskit „ <i>NucleoSpin Plasmid</i> “	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid-Reinigungskit „ <i>QIAGEN Plasmid</i> “	QIAGEN, Hilden
Reinigungskit für genomische DNA „ <i>NucleoSpin Tissue</i> “	Macherey-Nagel, Düren

2.5.2. Protein-Bestimmungs-, Reinigungs- und Modifikationskits

Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA-Kit	Pierce, St. Augustin
Reinigungskit für mit 6xHis-Tag modifizierten Proteinen	QIAGEN, Hilden
CR-Säulen mit immobilisierten Proteasen (Endoproteinase Glu-C, TPCK-Trypsin)	MoBiTec, Göttingen
ZipTip _{C18} für <i>reverse-Phase</i> -Chromatographie in der Pipettenspitze	Milipore, Eschborn

2.6. Geräte und andere Materialien

"Mighty Small" Elektrophorese	Hoefer, Freiburg
Biacore 1000	Pharmacia Biosensor AB, Uppsala/Sweden
EasyjecT PRIMA Elektroporator	PeqLab, Erlangen
Fluorometer LS50B	Perkin Elmer, Überlingen
FPLC Pharmacia LKB	Pharmacia, Freiburg
Gelprint 2000i	MWG Biotech, Ebersberg
Germizid-Lampe G8T5 ($\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$)	Sankyo, Denki/Japan
He-Cd-Laser 3225N (25 mW)	Liconix, St. Clara/USA
He-Cd-Laser OMI-3074-40M-R (40 mW)	Melles Griot, Carlsbad/USA

<i>HiTrap Desalting Column</i>	Pharmacia, Freiburg
HPLC System Gold™	Beckmann, München
Instant <i>Imager</i> ®2024	Canberra-Packard, Dreieich
Isoelektrophokusierung Phast System	Pharmacia, Freiburg
Microcon Säulen YM-3, 10, 50, 100	Amicon, Eschborn
Mikrotiterplatten	TPP Renner, Darmstadt
Mikrotiterplattenleser µQuant	MWG Biotech, Ebersberg
Mobicol Säulen	MoBiTec, Göttingen
QS Quatzküvette 100 µl	Hellma, Müllheim
RD-Exc-100 XeCl Eximer Laser	Radiant Dyes Laser Accessories GmbH, Wermelskirchen 1
Reflex III Massenspektrometer	Bruker, Bremen
Spektrophotometer DU-640	Beckmann, München
Transilluminator	Bioblock Scientific, Illkirch
UV-B-Lampe F8T5 ($\lambda_{\max} = 312 \text{ nm}$)	Sankyo, Denki/Japan
Zentrifuge Biofuge 13R	Heraeus, Hanau

3. Methoden

3.1. Standardmethoden

3.1.1. Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen

Die Konzentration von Proteinen und DNA wurde mit einem Beckmann DU640 Spektrophotometer in der 100 µl 1 cm Helma QS-Quarzküvetten oder in der Mikroplatte mit einem Mikroplatten Spektrophotometer „µQuant“ von MWG Biotech (Ebersberg) gemessen.

3.1.1.1. UV-Spektrometrie

Für eine DNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1 A₂₆₀ gleich 50 µg dsDNA/ml und 33 µg Oligonukleotid/ml gesetzt, bzw. über den spezifischen Extinktionskoeffizienten gerechnet. Proteinkonzentrationen in mg/ml wurden nach der Absorbtionsmessung bei 280 nm über den proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten oder nach der Methode von Ehresmann (1973) ($\text{mg}_{\text{Protein/ml}} = (A_{228,5} - A_{234,5}) / 3,14$) berechnet.

3.1.1.2. Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Protein- bzw. Peptidkonzentrationsbestimmung erfolgte nach „Micro BCA-Assay“ bei 562 nm. 100 µl BCA Lösung wurden mit dem gleichen Volumen der Proteinprobe in einer Mikrotiterplatte gemischt und vor Protein- Bestimmung 2 h bei 37 °C geschüttelt.

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurden 20 µl Probe mit 180 µl Bradford-Lösung ebenfalls in der Mikrotiterplatte 15 min bei RT inkubiert. Die Absorbtionsmessung wurde bei 595 nm durchgeführt. Die Kalibrierungskurve wurde aus den gleichzeitig gemessenen BSA-Proben definierter Konzentration abgeleitet.

3.1.2. Visualisierung von Proteinen und DANN

Zur fotografischen Dokumentierung der Gele und der Membran wurde ein Gelprint 200i System (MWG Biotech, Ebersberg) verwendet.

3.1.2.1. Coomassie-Färbung

Proteinbanden in PAAG mit mehr als 100 ng Protein/Spur können durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau nach (Sambrook *et al.* 1989) detektiert werden.

3.1.2.2. Silberfärbung

Silberfärbung von SDS-PAAG wurde nach Fa. Pharmacia Biotech Protokoll (ursprünglich (Heukeshoven & Dernick 1988) oder nach dem „5 Minuten-Protokoll“ (Ansorge 1985) durchgeführt.

3.1.2.3. Ethidiumbromidfärbung

Nicht-radioaktive DNA in Agarosegelen wurde durch die Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid bei Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel für 10 min in einer Lösung von Ethidiumbromid (5 µg/µl) geschwenkt. Nach 5 min Spülen in destilliertem Wasser wurden die DNA-Banden auf einem Transilluminator (Bioblock Scientific, Illkirch) detektiert.

3.1.2.4. PVDF-Membran Färbung mit Amidoschwarz

Nach dem Protein-Transfer vom Proteingel auf eine PVDF-Membran wurde die Membran, für 5 min in Amidoschwarz-Lösung geschwenkt. Darauf folgte 2x 5 min Entfärbung in der Entfärbelösung I (Methanol/ Essigsäure/ Wasser (90/2/8, v/v/v)). Die Membran wurde an der Luft getrocknet und die Proteinbanden konnten für eine Sequenzierung ausgeschnitten werden.

3.1.2.5. Detektion von radioaktiv markierten Proben

Radioaktiv markierte DNA in Gelen oder auf Membranen wurde durch Autoradiographie visualisiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Kodak XAR5) für 12 h bis zu 3–4 Tage auf das Gel bzw. Membran aufgelegt oder ein Flächenzählgerät vom Typ Instant Imager 2024 (Canberra-Packard, Dreieich) verwendet. Nach der elektronischen Autoradiographie ermöglicht eine Quantifizierung der radioaktiven Banden mittels Gerätsoftware.

3.1.3. DNA Hybridisierung

Für die ABF1-DNA-Bindungsanalyse wurden einzelsträngige Oligonukleotide zum Doppelstrang ergänzt. Ein Oligonukleotid wurde, wenn nötig, radioaktiv 5'-markiert, und mit einem 10–30 % Überschuss an unmarkiertem Gegenstrang in einem 1x NEB4 Puffer (20 mM Tris/AcOH, 10 mM Mg(OAc)₂, 10 mM K(OAc), 1 mM DTT, pH 7,9) versetzt. Nach einer 2 min Denaturierung bei 95 °C erfolgte die 5 min Inkubation bei 65 °C und 15–30 min – bei 37 °C. Die erhaltene dsDNA wurde bei –20 °C gelagert.

3.1.4. Proteintransfer auf PVDF-Membran

Für eine Protein-Übertragung aus SDS-Gelen wurde eine ProBlott-Membran (Schleicher&Schuell, Dassel) auf die Gelgröße zugeschnitten und die PVDF-Membran 3–5 mal in

Wasser, dann in Anodenlösung II gewaschen. SDS-Gel wurde 5 min in Anodenlösung II inkubiert.

In einer Trans-Blot Zelle (Bio-Rad, München) wurden erst 3 in Kathodenlösung angefeuchtete Whatman 3MM Papierblätter auf die Kathode aufgelegt, darauf folgte das SDS-PAAG, die PVDF-Membran, 1 in Anodenlösung II und 2 in Anodenlösung I angefeuchtete Whatman 3MM Papierblätter. An die geschlossenen Zelle wurde $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Strom für ca. 1 h angelegt. Nach der Membranfärbung (3.1.2.4) wurde die Membran an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Proteintransfers wurde eine Silberfärbung des SDS-Gels durchgeführt (3.1.2.2).

3.1.5. *Anzuchtbedingungen für Bakterien und Hefe*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in unterschiedlich großen Maßstäben: 1–4 l zur Überexpression von rekombinantem ABF1, 0,5–10 ml zur Gewinnung von Plasmid-DNA. Ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie wurde eine üN Kultur in 5–25 ml Medium, bzw. 0,5–1 ml Kultur für 2–4 h eingesetzt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Bei Ampicillin resistenten Stämmen wurde $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Antibiotikum zugegeben. Diese Kulturen wurden direkt für die Plasmidüberprüfung und –gewinnung oder zum Animpfen größerer Mengen Nährmedium verwendet. Zur Überexpression von ABF1 wurden die Zellen bei einer optischen Dichte von $2,5\text{--}4 \text{ OD}_{600}$ mit 2 mM IPTG induziert und 4 h weiter geschüttelt.

3.1.6. *Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von DNA*

3.1.6.1. *CaCl₂-kompetente Zellen*

Für die Herstellung von CaCl₂-kompetenten Zellen, wurden 100 ml des LB-Mediums mit 1 ml einer üN Kultur angeimpft, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 geschüttelt, für 10 min auf Eis gekühlt und 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskalter $0,1 \text{ M}$ CaCl₂-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, erneut pelletiert und in 2 ml CaCl₂-Puffer ($0,1 \text{ M}$ CaCl₂, $10 \text{ } \%$ (v/v) Glycerin) aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden portioniert (je $50 \text{ } \mu\text{l}$) mit flüssigem N₂ eingefroren und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für eine Transformation wurden $50 \text{ } \mu\text{l}$ kompetenter Zellen 30 min mit einem Ligationsansatz auf Eis, 90 s bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt (10 min). Anschließend wurden $900 \text{ } \mu\text{l}$ LB-Medium zugegeben und Transformationsansatz 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch 2 min Zentrifugieren bei 6000 g pelletiert, in ca. $50 \text{ } \mu\text{l}$ Überstand resuspendiert, auf einem Selektivmedium ausplattiert und üN bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bebrütet.

3.1.6.2. *Elektroporation*

Elektroporation-kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen wurden nach Anleitung (Fa. PeqLab, Erlangen) vorbereitet. 2 ml üN Kultur wurden in 200 ml LB-Medium zugegeben bis zu $A_{600}=0,6$ bei 37 °C geschüttelt. Das pellet wurde in 5 min durch Zentrifugieren bei 3000 rpm (SS34) erhalten. Das Pellet wurde 2-mal mit kaltem Wasser gewaschen und abzentrifugiert. Die in 1 ml 10 % Glycerin resuspendierten Zellen wurden schliesslich aliquotiert (40 µl) und nach dem Schockfrieren bei -70 °C gelagert.

Kompetenten Zellen wurden nach 1–5 min Inkubation mit 1–5 µl entsalzter DNA-Lösung in einer eiskalten Küvette in dem EquiBio Gerät (PeqLab, Erlangen) bei 2500 V elektroporiert. In 1 ml SOC-Medium resuspendierten Zellen wurden nach einer 1–2 h Inkubation bei 37 °C in der Kühlzentrifuge pelletiert, ausplattiert und üN bei 37 °C bebrütet.

3.2. *Standardmethoden für Gelelektrophorese*

3.2.1. *Agarose-Gelelektrophorese*

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Dazu wurden die Lösungen von 0,8–2,5 % (w/v) Agarose bzw. 1,5–3 % LMP-Agarose in 0,5x TBE- (für die DNA-Fragmente bis 1500 bp) bzw. in TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen an nativem Auftragspuffer versetzt, bei 120 V und +4 °C elektrophoretisch aufgetrennt. Visualisierung erfolgte durch Ethidiumbromidfärbung (3.1.2.3) oder Radiographie (3.1.2.5).

3.2.2. *Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)*

Die meisten Gelretardationsexperimente mit ABF1 und bis zu 40 bp langen Oligonukleotiden erfolgten in einem 6 % PAAG. 45 ml einer 6 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (29:1) in 0,5x TBE-Puffer mit 10 % Glycerin, bzw. TAE-Puffer wurden mit 20 µl TEMED und 70 µl 40 % (w/v) APS versetzt und zum Gießen eines Gels (200x200x1 mm) verwendet. Für die kleineren Gele (80x110x1 mm) wurden 10 ml Lösung vorbereitet. Nach einer 15 min Vorelektrophorese erfolgte eine 2–3 h Auftrennung der Bindungsansätze bei 220 V und +4 °C mit anschließender Autoradiographie des Gels (3.1.2.5).

Zur Überprüfung der DNA-Hybridisierungsansätze wurde eine Elektrophorese in 15 % PAAG bei 200 V und +4 °C durchgeführt.

Zum Nachweis der Proteinmultimerisierung, wurden Proteinproben in dem Auftragspuffer P_n auf ein 5–10 % PAAG (80x110x1 mm) in PN-Puffer aufgetragen. Als Laufpuffer diente der PN-Puffer mit 1 mM β -ME. Auftrennung von ABF1-Proben erfolgte für 4–6 h bei 120 V und +4 °C.

3.2.3. *Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)*

Zur Reinheitsuntersuchung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und präparativer Reinigung von Oligonukleotiden wurden 200x200x1 mm bzw. 80x110x1 mm 12–20 % denaturierende PAAG eingesetzt. Dazu wurden 45 ml einer 12–20 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (19:1) mit 8,3 M Harnstoff in TBE-Puffer mit 20 µl TEMED und 75 µl 40 % (w/v) APS versetzt. DNA-Proben wurden mit 1/3 Volumen an denaturierendem Puffer D_d gemischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach der Polymerisation und 15 min Vorelektrophorese des PAAGs erfolgte eine 1–3 h Auftrennung der Proben bei 45 mA und +50 °C. Detektion der Radioaktivität im Gel wurde mittels Autoradiographie (3.1.2.5) durchgeführt.

3.2.4. *SDS-PAGE nach Laemmli*

Zur Untersuchung von Proteinlösungen nach einer chromatographischen Reinigung sowie zur Analyse der Quervernetzungsansätze wurden diskontinuierliche SDS-Gele nach Laemmli (Laemmli 1970) in Größe 80x60x0,75 mm, 80x110x1 mm sowie 200x200x1 mm vorbereitet, wobei die 200x200x1 mm Gele für eine höhere Trennschärfe der radioaktiven Proben erforderlich waren. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Laemmli-Auftragspuffer versetzt und nach 3 min bei 95 °C auf das 10–16,8 % SDS-Gel (5 % Sammelgel) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 0,5–1,5 h bei 8 W in Laemmli-Laufpuffer. Proben im 200x200x1 mm Gel wurden 16 h bei 120 V getrennt. Visualisierung der Proteinbanden erfolgte gemäß 3.1.2.1 und 3.1.2.2, radioaktive DNA wurde mittels Autoradiographie (3.1.2.5) detektiert.

3.2.5. *SDS-PAGE nach Schägger-Jagow*

Diskontinuierliche SDS-Gele nach Schägger&Jagow (1989) dienen zur Spaltungsanalyse der Quervernetzungsansätze. Das 16,5 %-ige Trenngel (3 ml Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (19:1) mit 14 % Glycerin in Schägger-Jagow-Gelpuffer mit 0,003 % (v/v) TEMED und 0,03 % (v/v) APS) wurde mit 1,5 ml 10,8 % Trenngel (Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (19:1) in Schägger-Jagow-Gelpuffer mit 0,003 % (v/v) TEMED und 0,03 % (v/v) APS) und 1,5 ml 4,2 % Sammelgel (Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (19:1) in Schägger-Jagow-Gelpuffer mit 0,008 % (v/v) TEMED und 0,08 % (v/v) APS) beschichtet. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Schägger-Jagow-Auftragspuffer versetzt und nach einer 3 min Aufheizung bei 95 °C auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem „Mighty-Small“-System (Fa. Hoefer, Freiburg) für 1 h bei 30 V, 1 h bei 70 V und abschließend für 45 min bei 120 V in unterschiedlichen Laufpuffern für Kathode und Anode. Detektion der Proteinbanden wurde wie beschrieben (3.1.2) durchgeführt.

3.3. Isolierung und Reinigung von DNA

3.3.1. Phenolextraktion und Ethanol-fällung

Zur Entfernung von Proteinkomponenten aus DNA-haltigen Lösungen wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol/Chloroform (1/1, v/v) versetzt, kräftig geschüttelt und 2 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit einem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) gemischt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Ethanol gefällt.

Zur Ethanol-fällung wurden 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,5) und 2,5 Volumen absoluter Ethanol (-20 °C) zugegeben. DNA-Fällung erfolgte in 2 h bis üN bei -20 °C. Nach dem Zentrifugieren (30 min bei 12.000 g +4 °C) wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Luft getrocknet. Nach dem Auflösen des DNA-Pellets in einem geeigneten Puffer (z. B. TE) wurde die gereinigte DNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.2. Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

Kleine Mengen Plasmid-DNA für die Restriktions- und PCR-Analysen wurden mittels Plasmidpräparationen im „Boiling-Prep“-Verfahren (Sambrook *et al.* 1989) (aus 1,5 ml Bakterien üN Kultur) erhalten.

Als schnellere Methode für „Test“-Experimente wurde ein „Schnell-Prep“-Verfahren verwendet, wofür nur kleine Mengen (200–500 µl) von in 4–6 h gewachsener Bakterienkultur nötig sind. Die nicht-pelletierte Bakterienkultur wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) 1 min geschüttelt und 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit 70 % Ethanol und schließlich eine Zentrifugation. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer mit 0,01 mg/ml RNase aufgenommen.

Für die DNA-Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus 5–8 ml Bakterienkultur mittels kleinen Säulen (Reinigungskit Fa. Macherey-Nagel oder Qiagen) isoliert.

Präparative Plasmidreinigung wurde nach dem Midi-Plasmid-Reinigungsprotokoll Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt.

3.3.3. Reinigung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten über PAGE

Oligonukleotide oder kurze PCR-Produkte (bis 150 bp) wurden mittels denaturierender bzw. nativer PAGE aus einem 12–20 % Gel gereinigt. Die radioaktiven DNA-Banden wurden durch Autoradiographie, die nicht radioaktiven Banden durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm auf einer fluoreszierenden DC-Platte sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Nach einer üN Elution bei RT in TE-Puffer wurden die Gelstücke abfiltriert und die Oligonukleoti-

de oder PCR-Produkte mit Ethanol gefällt. Das erhaltene Pellet wurde in einem TE- oder 5 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst und DNA-Menge durch eine Absorbationsmessung (3.1.1.1) bestimmt.

3.3.4. *Reinigung der DNA-Spaltungs- und PCR-Produkten*

DNA-Fragmente für Klonierungsexperimente wurden während einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit einem *QIA-GEN II*- (Qiagen, Hilden) oder *Nucleotrap-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers wiedergewonnen. Die Verwendung von *QIAquick*-Mikrozentrifugationssäulen (Qiagen, Hilden) ermöglichte eine schnelle Entfernung von Primern, kurzen DNA-Restriktionsfragmenten, Enzymen und Salzen aus PCR- und DNA-Spaltungsansätzen.

3.4. *Enzymatische Behandlung von DNA*

3.4.1. *Enzymatischer DNA-Verdau und Dephosphorylierung*

DNA-Verdau mit Restriktionsnukleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Allgemein wurde pro ca. 1 µg DNA 1 U Restriktionsnuklease zugegeben und 1 h bei der vom Hersteller empfohlener Temperatur inkubiert.

3.4.2. *5'-Phosphorylierung mit T4 Polynukleotidkinase*

1–20 pmol des zu markierenden Oligonukleotids bzw. 500 ng dephosphorylierten DNA-Standards wurden in 10–20 µl des einfachen PNK-Puffers mit 0,01–1 MBq [γ -³²P]-ATP und 1–5 U T4 Polynukleotidkinase für 30–60 min bei 37 °C inkubiert.

Markierungsansätze wurden anschließend mit TE-Puffer auf 50 µl verdünnt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Freies [γ -³²P]-ATP wurde mittels einer Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Der Markierter Ansatz wurde auf eine mit TE-Puffer äquilibrierte Sephadex G25-Mikrozentrifugationssäule aufgetragen und nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 735 g eluiert.

3.4.3. *Ligation*

30–50 ng linearisierter, dephosphorierter Vektor wurden in einem Ligase-Puffer mit 1 U T4 DNA-Ligase und dreifachem molarem Überschuss an DNA-Fragment üN bei 16 °C inkubiert. Um Ligationseffizienz in dem pGEM-T-Vektor zu erhöhen, wurde der gereinigte PCR-Produkt zusätzlich 15–30 min mit der Taq DNA-Polymerase in einem Taq-dATP-Puffer (Reaktionspuffer für Taq DNA-Polymerase mit 2,5 mM MgCl₂ und 0,2 mM dATP) bei 72 °C inkubiert („pGEM-T“ Klonierungskit, Promega, Mannheim). Für die DNA-Transformation mittels Elektroporation wurde der Ligationsansatz auf 50 µl mit Wasser verdünnt, vorsichtig

mit 50 µl Chlorophorm gemischt, 2 min bei 10.000 g zentrifugiert und mit Ethanol gefällt. Gereinigte DNA wurde in 5–10 µl Wasser gelöst.

3.4.4. DNA-Amplifikation (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde für analytische Untersuchungen in Volumen von 10–20 µl, für präparative Erzeugung von DNA-Sonden in einem Volumen von 100–200 µl durchgeführt. Für die radioaktive Markierung der PCR-Produkte standen entweder [γ - ^{32}P]-ATP markierte Primer oder [α - ^{32}P]-dATP zur Verfügung.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde in einem Reaktionspuffer mit 0,2 mM dNTPs, je 1 µM Primer, 1–2,5 mM MgCl_2 , 0,05–0,1 U/µl DNA-Polymerase und 0,2–10 ng DNA-Matrize durchgeführt.

3.4.4.1. Kolonien-PCR

Für die Überprüfung von Transformanten aus *E. coli* wurde jeweils 1 Kolonie von einer Agar-Platte 2–3 h auf der Mikrotiterplatte in 200 µl selektives LB-Medium bei 37 °C bebrütet. 50–100 µl Zellkultur wurden 2 min bei 6000 g zentrifugiert, in 10–20 µl Wasser aufgenommen, 5 min bei 95 °C erhitzt und pelletiert. 2–5 µl DNA-Lösung wurden in eine PCR eingesetzt. Einer von den beiden Primern war der Plasmidsequenz komplementär, der andere hybridisierte innerhalb des ligierten Fragmenten. Nach einer Aufheizperiode von 5 min bei 94 °C folgten 25 Zyklen je 40 s bei 94 °C, 40 s bei 50 °C und 40–90 s bei 72 °C. Entstandene PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (3.2.1) aufgetrennt. So konnten die Transformanten mit dem kloniertem Ligationsprodukt identifiziert werden.

3.4.4.2. „In Gel“-PCR

„In Gel“-PCR wurde für die Erzeugung präparativer Mengen an im SELEX-Verfahren gewonnener DNA eingesetzt. Nach EMSA in LMP-Agarose-Gel wurde der DNA-ABF1-Komplex aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und für 10 min bei 65 °C geschmolzen. Durch Zugabe von steriler 1 mM MgSO_4 -Lösung wurde die Agaroselösung bis 1,0 % verdünnt. 5–50 ng DNA in Agarose wurden in 100 µl Vent-Reaktionspuffer mit 0,2 mM dNTPs, je 1 µM Primer (1–10 % des Primers wurden radioaktiv eingesetzt) und Gegenprimer, 2 mM MgSO_4 , 4 U Vent-DNA-Polymerase amplifiziert. Nach einer Aufheizphase von 15 s bei 94 °C wurden 25 Zyklen von je 5 s 94 °C, 5 s 55 °C, 5 s 72 °C durchgeführt. PCR-Produkten wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach (3.3.4) eluiert.

3.4.4.3. PCR-vermittelte Erzeugung eines Expressionsvektors

Zur Expression eines Teils des DNA-Bindungsfaktors ABF1 musste das *abf1*-Gen verkürzt und in einen Expressionsvektor eingebracht werden. Dazu wurden je 1 µM verschiedene Primer zur Erzeugung gewünschter Fragmente in 100 µl Taq-Reaktionspuffer mit 0,2 mM

dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 4 U Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Nach einer Aufheizphase von 3 min bei 94 °C wurden 30 Zyklen von je 1 min 94 °C, 1 min 48–60 °C (die Temperatur wurde der Primer-Schmelztemperatur angepasst), 1 min 72 °C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden, falls nötig, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, eluiert (3.3.4) und weiter verarbeitet.

3.4.4.4. *PCR-vermittelte Erzeugung von ARS1-Element*

PCR-Ansätze zur Erzeugung von markierten Sonden für die Bindungsansätze hatten ein Volumen von 100–200 µl. 5'-[γ-³²P] bzw. I⁵dUTP markierter Primer wurde mit verschiedenen Gegenprimern zur Erzeugung gewünschter Fragmente in Taq-Reaktionspuffer mit 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 4 U Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Nach einer Aufheizphase von 1 min bei 94 °C wurden 30 Zyklen von je 30 s 94 °C, 30 s 48–60 °C (die Temperatur wurde Primersequenz abhängig geändert) und 30 s 72 °C durchgeführt. Darauf folgte eine Auffüllphase von 5 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt bzw. direkt aus dem PCR-Ansatz nach (3.3.4) gereinigt.

3.5. *Chromatographische ABF1-Reinigung*

3.5.1. *Überexpression von ABF1 in E. coli*

Vor der Isolierung von ABF1 oder Proteinmutanten in größerem Maßstab wurden Expressionen in 0,5–1 ml Medium durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellkolonien von der LB-Platte entnommen, in 0,5–1 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum eingesetzt, bis zu OD₆₀₀ von 1,2–2,0 bei 37 °C geschüttelt, 2 mM IPTG zugegeben und weitere 4 h inkubiert. 50–100 µl der Zellkultur wurden 2 min bei 3000 g abzentrifugiert und in 10 µl SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Davon wurden 2–5 µl auf ein SDS-Laemmli-Gel aufgetragen und nach der PAGE visualisiert (3.2.4).

Zur Überexpression von rekombinantem ABF1-Protein oder Proteinmutanten in größerem Maßstab wurden 5–200 ml des LB-Mediums mit Ampicilin (100 µg/ml) mit transformierten *E. coli* XL1 Blue Zellen (pQE12-ABF1 und pQE12-ABF1-Fragmente) angeimpft und üN bei 37 °C geschüttelt. ÜN Kultur wurde 1:20 mit frischem Medium mit Antibiotikum verdünnt und kräftig geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 2,5–4,0 wurde die Proteinexpression für 4 h mit 2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 g geerntet und bis zum Aufschluss bei –20°C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 3–4 Volumenteilen (w/v) Beschallungspuffer (50 mM Na-Phosphat (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF) aufgenommen, entsprechende Menge an Protease-Inhibitoren (Tabletten bzw. 1000faches Protease-Inhibitorenmix: Leupeptin A (5 mg/ml), Pepstatin A (1 mM), Aprotinin (0,1 mg/ml), E 64 (1 mM)) und 1 mg/ml Lysozym zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zellaufschluss wurde entweder durch

6x 30 s Ultraschall-Behandlung im *Branson Sonifier B15* (Branson, Bad Liebenzell) bei 50 % der maximalen Ausgangsleistung oder durch 40 min Rühren bei +4 °C in einer mit Stickstoff gefüllten Parr-Bombe (Parr Instruments, Moline/USA) erreicht. Um die Viskosität der Lösung zu verringern, wurde das Zellysate 10 min auf Eis mit 10 µg/ml Rnase A und 5 µg/ml DNase I inkubiert, 30 min bei 10000 g, 15 min bei 15000 g und +4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für die Reinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie eingesetzt (3.5.2.1).

3.5.2. *FPLC-unterstützte Säulenchromatographie*

3.5.2.1. *Anreicherung von ABF1 über Ni²⁺-Affinitätschromatographie*

Für eine präparative Proteinreinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde das „Batch“-Verfahren angewendet. Alle Arbeiten erfolgten bei +4 °C. Der Überstand wurde mit 1/3–1/5 Volumen an mit dem Beschallungspuffer äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Agarose, bzw. Ni²⁺-NTA-Superflow (Bindungskapazität 5–10 mg Protein/ml) 30–60 min gerührt und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde solange mit einem Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) bei einer Flussrate von 1–2 ml/min gespült, bis die Basislinie der Chromatogramm stabil blieb. Aufgrund eines Stufengradienten der Imidazolkonzentration im Waschpuffer (bis zu 250 mM) wurde das Protein von der Säule eluiert, wobei die Lösungsmenge in jeder Gradientenstufe ca. 5 Säulenvolumen betrug. ABF1-haltige Fraktionen wurden vereint, gegen ein Ionenaustauscher-Auftragspuffer dialysiert, bzw. mit dem Puffer mindestens 4fach verdünnt, um die Salzkonzentration in der Proteinlösung vor dem Auftrag auf eine Ionenaustauschsäule, zu senken.

3.5.2.2. *Reinigung von ABF1 mittels Ionenaustausch-Chromatographie*

Zur weiteren Reinigung wurde eine mit ca. 2 ml Sulfopropyl-Sepharose (SP-Sepharose) gefüllte Säule mit dem Puffer A/100 (50 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 % Glycerin, 100 nM NaCl) äquilibriert, mit der Proteinlösung aus 3.5.2.1 beladen und mit dem gleichen Puffer gewaschen. Es wurde ein Stufengradient bis zu 1 M NaCl in Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min angelegt und Fraktionen je 1 ml aufgefangen.

Der Puffer von proteinhaltigen Fraktionen mit ARS1-Bindeaktivität wurde gegen Dialysepuffer (2.4) ausgetauscht, die gewonnenen Proteinproben wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70 °C gelagert.

3.5.3. *Reinigung von ABF1 in analytischem Maßstab*

Für eine Isolierung kleiner Mengen an ABF1-Protein oder ABF1-Mutanten wurden mit gewünschtem Ionenaustauscher (SP-Sepharose, DEAE) oder mit der DNA-Cellulose gefüllte Spinsäulen (MoBiTec, Göttingen) verwendet. Die maximale Menge an Chromatographiematerial in der gepackten Säule betrug ca. 0,5 ml. Die Proteinlösung wurde gegen den Auf-

tragspuffer dialysiert bzw. mit dem Puffer verdünnt. Die Säulen wurden mit dem entsprechenden Auftragspuffer äquilibriert und nach der Proteinzugabe für 10–15 min bei +4 °C inkubiert. Auf eine Spinsäule wurden 2x je 500–700 µl Auftragspuffer mit steigender Salzkonzentration gegeben und jedes Mal für ca. 1 min bei 500–1500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Eluat wurde gesammelt und in SDS-PAGE und EMSA analysiert. In der Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde das Protein unter denaturierenden oder nativen Bedingungen gemäß Bedienungsanleitung über Ni²⁺-NTA-Spinsäulen (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die gewonnenen DNA-bindeaktiven Proteinfraktionen wurden, falls nötig, dialysiert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70 °C gelagert.

3.5.4. Gelfiltration mittels HPLC

Die Analyse der Protein- und DNA-Komplexen erfolgte mit einer HPLC-Anlage „System Gold“ (Beckmann, München) auf Bio-Sil TSK-Säulen: TSK 250, Porengröße 250 Å (Bio-Rad, München), TSKgel G4000SW, Partikelgröße 13 µm, Porengröße 450 Å (TosoHaas, Stuttgart) oder TSKgel G3000SW, Partikelgröße 10 µm, Porengröße 250 Å (TosoHaas, Stuttgart) 600x7,5 mm mit einer Vorsäule TSKgel SW 75x7,5 mm, Partikelgröße 10 µm (TosoHaas, Stuttgart) angeschlossen. Als Lauf- und Elutionslösung diente ein 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) mit 100 mM Na₂SO₄. Eine Auftrennung von ABF1, DNA und deren Komplexe wurde in 56–65 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit kontinuierlicher Absorptionsdetektion bei 210, 260, 280 nm durchgeführt. Als Massenstandard wurde eine Proteinmischung „gf5“ bzw. „gf7“ (2.1.5) verwendet. Die Kalibrationskurve wurde nach der Formel berechnet:

$$\text{LogMW} = K_{AV} = (t_E - t_0)/(t_T - t_0) \quad \text{Gl. 4-1}$$

Wobei t_E = Elutionszeit des jeweiligen Signals
 t_0 = Elutionszeit, die dem leeren Säulenvolumen entspricht
 t_T = Elutionszeit von PABA

3.6. Untersuchung der ABF1-DNA-Wechselwirkung

3.6.1. Gelretardationsexperimente

Gereinigtes ABF1-Protein wurde für Gelretardationsexperimente in einem Bindungspuffer (2.4) mit 1,87 µM-bp Kompetitor-DNA (poly[dl-dC]) und 0,1 mg/ml BSA titriert. Je 5 µl der Proteinlösung wurden mit 5 µl radioaktiv markierter DNA in dem Bindungspuffer 10–15 min auf Eis bzw. RT inkubiert. Nach dem Zufügen von 3 µl nativem Auftragspuffer D_n wurden die Ansätze in einem nativen PAAG in TBE(ABF1)-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.2). Die Bindungsbedingungen der einzelnen Experimente sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1 Bedingungen der ABF1-DNA-Bindungsexperimente. RT: Raumtemperatur.

Experiment	Puffer	c_{NaCl} [mM]	T [°C]
ARS120 mit versch. Sondenlänge	H005 (pH 7,5)	75	+4
DNA-Sonden aus Promotorregion	Ref/201 (pH 8,0)	50 / 5 mM MgCl ₂ / 0,5 mM CaCl ₂	RT
ARS-Motive	Ref/201 (pH 8,0)	50 / 5 mM MgCl ₂ / 0,5 mM CaCl ₂	RT
Modifiziertes und fehlgepaartes ARS1-Motiv	H005 (pH 7,5)	50	+4
Aptamere nach der DNA-Selektion	H005 (pH 7,5)	75	+4

3.6.2. DNA-Selektion *in vitro*

Für die Selektion der an ABF1-bindenden DNA-Molekülen wurde ein randomisierter, 74 bp langer DNA-Pool mit variablen 30 bp in der Oligonukleotidmitte eingesetzt. Das durchgeführte SELEX-Verfahren basierte auf Gelretardationsexperimente und PCR des isolierten DNA-Pools. Es wurden 15 Selektionszyklen wie folgt durchgeführt.

Das ABF1-DNA-Bindungsexperiment (3.6.1) wurde in 10–20 µl des H005-Puffers mit 5 mM MgCl₂ und einer bestimmten NaCl-Konzentration (Tabelle 3-2) durchgeführt.

SELEX-Zyklus	DNA [pmol]	ABF1 [pmol]	c_{NaCl} [mM]
1	2,0	2,0–24,0	100
6	0,1	0,37–1,5	100
10	0,1	0,37–1,5	200
13	0,1	0,37–1,5	300
14	0,1	0,25–1,0	350

Tabelle 3-2 Zusammensetzung und Änderungen des ABF1-DNA-Bindungsansatzes im SELEX-Verfahren

DNA wurde zusammen mit steigender Menge an ABF1 15–20 min bei +4 °C inkubiert und nach dem Zufügen von 2 µl nativer Auftragspuffer D_n und 2 µl 64 % Glycerin auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung (3.2.1) im 2,5 % LMP-Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer wurde die radioaktive DNA im Instant Imager visualisiert, die gebundenen DNA-Aptamere (Bindungsausbeute lag zwischen 0,1 und 30 %) ausgeschnitten und in die Amplifikation mittels „In Gel“-PCR (3.4.4.2) eingesetzt. Zur DNA-Reinigung wurden die PCR-Proben mit D_n-Puffer versetzt und auf ein Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung des DNA-Pools in 8 % nativem PAAG (3.2.2) bei 250 V bzw. im 3,5 % LMP-Agarosegel bei 120 V und +4°C, wurde eine radioaktive 74 bp DNA-Bande ausgeschnitten und nach der Elution aus dem Gel (3.3.3), Ethanolfällung, Konzentrationsbestimmung und, falls nötig, radioaktiver Markierung mit [γ -³²P]-ATP (3.4.2) in den neuen Selektionszyklus angesetzt.

3.6.3. SPR-Messung der ABF1-DNA-Bindungskinetik

Oberflächenplasmonen-Resonanz-Methode wurde seit einigen Jahren für eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in biologischen Systemen verwendet. Dabei wird ein Reaktionspartner (Ligand) an der Oberfläche eines Chips in einer Messzelle

des Biacore-X Gerätes (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala/Sweden) gebunden. Durch Zugabe von Analyten wird die Änderung des Laserlichtsignals registriert und in den so genannten *Resonance Units* grafisch dargestellt.

Für die ABF1-DNA-Bindungskinetikanalyse wurden kommerziell erworbene SA-Chips verwenden, wobei es sich um einen Mikrochip handelt, der auf seiner Goldoberfläche eine carboxymethylierte Dextranschicht (50 nm dick) mit immobilisiertem Streptavidin trägt. Die am 3'-Ende mit Biotin modifizierten 28 bp langen dsDNA-Fragmente wurden mit einer Signalantwort 30–150 RU auf der Chip-Oberfläche nach den Angaben des Herstellers immobilisiert. Die erste Messzelle wurde mit einer unspezifischen DNA beladen und als Kontrolle verwendet. Die gleiche Menge an spezifischer DNA wurde in der zweiten Messzelle immobilisiert.

Messungen der ABF1-Bindungskinetik wurden bei einer Flussrate von 10–80 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 10–35 $^{\circ}\text{C}$ in einem HBS-Puffer mit variierender NaCl-Konzentration (100–500 mM) gleichzeitig in beiden, mit spezifischer und unspezifischer DNA beladenen, Messzellen durchgeführt. Als Vorexperiment wurde ABF1 mit einer Konzentration nah des vermutlichen K_D -Wertes für die immobilisierte DNA injiziert und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten berechnet. Mittels des „BiaSimulation“-Programm (Fa. Biacore, Freiburg) konnten die Kinetikkurven simuliert und nötige Proteinkonzentrationen für eine Messreihe festgelegt werden. Eine Messreihe bestand aus 6–10 Messungen in denen die ABF1-Konzentration zwischen 0,1x und 10x K_D -Wertes variiert wurde. Mittels des „BiaEvaluation“ 3.0-Programms (www.biacore.com/products/biaeval.shtml) (als eine Alternative stand kostenlose CLAMP99-Software – www.cores.utah.edu/interaction/clamp.htm – zur Verfügung) wurden die aufgenommenen Sensogramme bearbeitet, wobei eine unspezifische Bindung bzw. Puffereffekte aufgrund der Messwerten in der ersten Messzelle eliminiert wurden. Aus den erhaltenen Kurven konnten statistisch relevante Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten nach verschiedenen Kinetikmodellen berechnet werden. Für die Auswertung der Messdaten wurden zuerst die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt und die erhaltenen k_D -Werte in die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_A) eingesetzt. Ebenfalls wurden Diffusionskonstanten, die einen Einfluss auf Reaktionskinetik haben können, bestimmt.

Die Berechnung der Gleichgewichts- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bzw. daraus folgende Ableitungen sind im Anhang 8.3 dargestellt. Aus den bei unterschiedlichen Temperaturen gemessenen Gleichgewichtskonstanten (K_D) lassen sich energetische Parameter (ΔG , ΔH , ΔS und ΔC_p) der ABF1-DNA-Bindungsreaktion bestimmen.

3.6.4. Quervernetzungsexperimente

3.6.4.1. Laservermittelte Photoquervernetzung

Alle Experimente bis zur Bestrahlung der Proben wurden im Dunkeln durchgeführt, um eine Zersetzung der iod-haltigen DNA zu vermeiden. Für die Bestrahlungsexperimente wurden 0–5 μM ABF1 sowie 18,7 μM -bp poly[dl/dC] als Kompetitor-DNA in einem Volumen zwischen 50 μl und 1 ml HOO5- bzw. M005-Puffer 5 min bei +4 °C inkubiert. Nach der Zugabe von markiertem ARS1-Element (5–500 nM) folgte eine 10–15 min Inkubation auf Eis in den Quarzküvetten Hellma QS (Hellma, Müllheim), Schichtdicke 0,1 cm (für Experimente mit XeCl-Laser), 0,5 cm oder 5 cm (für Experimente mit HeCd-Laser) mit anschließender Laser-Bestrahlung.

Zum Einsatz kamen HeCd-Laser 3200 (Leistung 25 mW) und OMI-HeCd-Laser (Leistung 40 mW), die ein kohärentes Licht der Wellenlänge 325 nm erzeugen. Die Bestrahlungsdauer betrug bis zu 14 h.

Ein mit einer Ne/Xe/HCl-BCl₃ Gasmischung (98,4:1,5:0,1 (v/v/v)) gefüllter RD-exc-100 Laser emittiert ein kohärentes Licht der Wellenlänge 308 nm. Bei einer Pulsdauer von 5 ns strahlt der XeCl-Laser eine Pulsenergie bis zu 150 mJ aus. Je nach Experiment betrug die Pulsfrequenz zwischen 1 und 25 Hz, die Quervernetzungsansätze wurden mit bis zu 15000 Pulse bestrahlt.

3.6.4.2. Protein-DNA-Quervernetzung mittels UV-B und UV-C Bestrahlung

ABF1-DNA-Bindungsansätze (wie unter 3.6.4.1 beschrieben) wurden auf einer Mikrotiterplatte bei +4 °C mit einer UV-Lampe (254 nm oder 312 nm) bestrahlt. Die Bestrahlung dauerte bis zu 2 h bei 254 nm und bis zu 12 h bei 312 nm.

Nach der limitierenden Spaltung mit Trypsin (3.7.4.1) wurde 1 μM des gespalteten Proteins in 25–50 μl des Bindungspuffers (50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 75 mM NaCl) mit 0,1 μg poly[dl/dC] und 0,1 μM 27 bp DNA 10 min inkubiert und anschließend 1,5 h bei 4 °C mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Quervernetzungsansätze wurden bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert.

3.6.4.3. Chemische Protein-Protein-Quervernetzung

Um kovalente ABF1-Multimerkomplexe zu erhalten, wurden verschiedene ABF1-Mengen mit Überschuss an DNA gemischt, 10 min bei +4 °C und anschließend in 0,2 M Triethanolamin-Puffer (pH 8,0) mit 10 mM DMS (Dimethyl-Suberimidat) 1–2 h bei RT in gesamtem Volumen von 20 μl inkubiert (Lipps *et al.* 2001).

3.7. *Reinigung und Untersuchung von ABF1-DNA-Quervernetzungsprodukten*

3.7.1. *Elution aus präparativem Laemmli-Gel*

3.7.1.1. *Diffusionsbedingte Elution aus SDS-PAAG*

Die Elution der Quervernetzungsprodukte aus dem SDS-PAAG erfolgte nach QIAGEN-Protokol und nach Lee (Lee *et al.* 1998). Nach der PAGE und autoradiographischer DNA-Detektion wurde die Protein-DNA-Bande ausgeschnitten, zerkleinert und mit vier Volumen des Diffusionspuffers (QIAGEN) 1 h bei 50 °C geschüttelt. Kleine Mengen an Eluat wurden entweder über mit silanisierter Glaswolle gefüllten Eppendorfgesäß mit einem Loch oder über eine Spinsäule mit Filter abzentrifugiert. Für größere Eluatmengen wurde eine Spritze mit einem 0,22 µm Filter (Roth, Karlsruhe) verwendet. Das Filtrat wurde mit Aceton präzipitiert (3.7.2.1) und nach Trypsinverdau (3.7.4.2) mit Glassuspension *QIAEX II* (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

3.7.1.2. *Elektroelution*

Die Elution der analytischen Mengen an Quervernetzungsprodukte aus einem SDS-PAAG erfolgte nach (Escott *et al.* 1998). Nach der PAGE und autoradiographischer DNA-Detektion wurde das ausgeschnittene Gelstück mit Protein-DNA-Bande in einen mit Laemmli-Puffer gefüllten Dialyseschlauch überführt. Durch eine 3 h horizontale Elektrophorese bei 50 mA wurde der ABF1-DNA-Komplex aus dem Gel eluiert. Nach der Änderung der Stromrichtung und 1 min Elektrophorese, konnten die an der Dialysemembran gebliebene Komplexe in die Lösung zurückgeführt werden. Das Gelstück wurde autoradiographiert und falls nötig wurde die Elektrophorese noch mal wiederholt. Nach der Eluatfällung mit Aceton (3.7.2.1) wurde das Pellet in einem für weitere Schritte geeigneten Puffer aufgenommen.

3.7.2. *Fällung und Konzentrierung des Protein-DNA-Komplexes*

3.7.2.1. *Acetonfällung*

Protein-DNA-Addukte wurden zu einer Reinigung und Konzentrierung mit vier Volumen Aceton bei -70 °C mindestens 4 h oder üN gefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 10000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

3.7.2.2. *Phenol/Ether Extraktion*

Phenol/Ether Extraktion wurde nach Sauve durchgeführt (Sauve *et al.* 1995). Proteinlösung wurde 20 s mit gleichem Volumen an Phenol im Vortex geschüttelt und 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Die obere Phase, die Nukleinsäuren enthält, wurde entfernt und die Phenolphase mit zwei Volumen an Ether versetzt. Nach dem Schütteln und Zentrifugieren wurde das restliche Phenol aus der unteren Phase durch Zugabe von Ether und abschließendes Zentrifugieren entfernt. Die untere wässrige Phase wurde lyophilisiert und das Proteinpellet in passendem Puffer aufgenommen.

3.7.2.3. *Methanol/Chloroform Präzipitation*

Methanol/Chloroform Extraktion wurde nach Wessel durchgeführt (Wessel & Flugge 1984). 0,1 ml Protein-DNA-Lösung wurde mit vier Volumen an Methanol versetzt, gemischt und 10 s bei 9000 g zentrifugiert. Nach der Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurde die Probe 10 s bei 9000 g zentrifugiert. Zur Phasentrennung wurde 0,3 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase in 1 min bei 9000 g aufgetrennt. Die obere Phase wurde entfernt, die untere mit 0,3 ml Methanol gewaschen und für 2 min bei 9000 g zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde nach der Entfernung des Überstands an der Luft getrocknet und in einem Puffer aufgenommen.

3.7.2.4. *QIAEX II Protokoll für DNA-Reinigung und Konzentrierung*

Um Peptide und Proteine vom Quervernetzungsprodukt zu trennen, wurden Protein- und Peptid-DNA-Komplexe nach einem modifizierten QIAGEN-DNA-Reinigungsprotokoll isoliert. Zum Quervernetzungsprodukt wurden 6 Volumen QX1-Puffer und 20 µl *QIAEX II* / 5 µg DNA zugegeben und bis 30 min bei RT langsam geschüttelt. Nach 30 s Zentrifugieren bei 10000 g wurde der nicht-radioaktive Überstand entfernt. Falls das Supernatant radioaktiv war, wurde die Inkubation mit *QIAEX II* wiederholt und danach die erhaltenen radioaktiven Pellets vereint. Nach dem Waschen mit 500 µl PE (zweimal) wurde das Pellet bei RT getrocknet, die gebundene DNA in 20–50 µl 10 mM CH₃COO(NH₄) Puffer (pH 8,5) eluiert. Vor den MALDI-MS-Untersuchungen wurden die Proben, falls nötig, noch mittels Reverse-Phase-Chromatographie mit ZipTip_{C18} (Milipore, Eschborn) gereinigt.

3.7.3. *Chromatographische Reinigung des kovalenten ABF1-DNA-Komplexes bzw. Spaltungsproduktes*

Die analytische Reinigung des kovalenten DNA-Protein-Komplexes erfolgte mittels Ni²⁺-Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie. Nach der Quervernetzungsreaktion und einem Pufferaustausch konnte der DNA-ABF1-Komplex an einer Ni²⁺-NTA-Spinaule gebunden werden, die freie DNA wurde ausgewaschen und das Protein zusammen mit dem

Protein-DNA-Komplex wurde von der Säule mit 250 mM Imidazol nach der Anleitung des Herstellers eluiert.

Für eine Ionenaustauschchromatographie wurden Spinsäulen mit 100–200 µl DEAE gefüllt und mit einem Auftragspuffer mit 100 mM NaCl äquilibriert. Nach dem Auftragen des Quervernetzungsansatzes bzw. der ABF1-DNA-Spaltungsprodukten wurden je 200 µl des Auftragspuffers mit steigender NaCl-Konzentration auf die Säule pipettiert und nach 1 min Zentrifugieren bei 900 g wurde das Eluat gesammelt. Als Reinigungskontrolle wurde das ABF1-Protein und tryptische ABF1-Fragmente ebenfalls über den Ionenaustauscher gereinigt. Die Eluationsprodukte wurden in einem denaturierenden Gel getrennt und visualisiert.

3.7.4. Chemische Spaltung und enzymatischer Verdau der Quervernetzungsprodukten

Die Spaltungsprodukte wurden in einem Peptidgel bzw. denaturierendem PAAG aufgetrennt (3.2.5). Visualisierung radioaktiver DNA erfolgte im InstantImager, Peptide wurden nach der Silberfärbung detektiert.

3.7.4.1. Limitierender ABF1-DNA Spaltung mit Trypsin und Analyse erhaltener Fragmenten

Für eine limitierte Proteolyse wurden 25–50 ng Trypsin zu 25–50 µg ABF1 zugegeben und bis zu 16 h bei 37 °C inkubiert. Während der Verdauungsreaktion wurden 10 µl Aliquots entnommen und nach der Zugabe von 25–50 ng Trypsin Inhibitor Typ I-S bis zu weiterer Bearbeitung bei –20 °C gelagert. Ein Teil des Verdauungsansatzes wurde in der Quervernetzungsreaktion mit DNA eingesetzt (3.6.4.2) und nach der UV-Bestrahlung zusammen mit verdauten ABF1-Proben während einer SDS-PAGE aufgetrennt.

25 µg ABF1 nach 1 h limitierenden Verdaus und einer Auftrennung im SDS-PAAG wurden auf eine PVDF-Membran übertragen (3.1.4). Vier Proteinfragmente, die voraussichtlich der ABF1-Domäne entsprechen, wurden sequenziert.

3.7.4.2. Enzymatischer Verdau

Für einen Proteaseverdau wurde ein 0,5–5facher Überschuss (w/w) an Chymotrypsin oder Trypsin zu dem ABF1-DNA-Komplex bzw. ABF1 zugegeben und der Ansatz wurde bis zu 24 h bei 37 °C inkubiert. Um die Verdauungsreaktion zu beschleunigen, wurde der tryptische Verdau in einem Puffer mit 2 M Harnstoff durchgeführt.

Um die Protease bzw. autoproteolytische Fragmente aus dem Verdauungsansatz auszuschließen und die gespaltenen Proben gleich lyophilisieren zu können, wurde die Spaltung des Proteins und Quervernetzungsproduktes auf einer mit Trypsin, bzw. Endoproteinase Glu-C beladenen Spinsäule (MoBiTec, Göttingen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um den Proteinanteil im radioaktiven Komplex nachzuweisen, wurden 10–20 µl des Quervernetzungsansatzes für 1 h bei 37 °C mit 0,1 µg Proteinase K behandelt.

Diese Ansätze wurden entweder direkt auf ein SDS-Peptidgel bzw. denaturierendes PAAG aufgetragen oder über eine DEAE-Säule bzw. mit *QIAEX II* DNA-Reinigungskit gereinigt und dann einer denaturierenden PAGE unterzogen.

3.7.4.3. *Proteinspaltung mit Hydroxylamin*

Das Protokoll zur Spaltung der Asn-Gly Bindung orientiert sich an Bornstein (Bornstein & Balian 1977). Verschiedene Mengen an ABF1 und an über Ni²⁺-NTA Spinsäule gereinigten ABF1-DNA-Komplex wurden in einem 4 M Guanidin/ 4 M Hydroxylamin Puffer (pH 9,0) bis zu 4 h bei 45 °C inkubiert. Inkubationszeiten und Guanidin/ Hydroxylamin Verhältnis wurden experimentell optimiert.

3.7.4.4. *Chemische Proteinspaltung mit NTCB*

Das Protokoll zur Spaltung der X-Cys Peptidbindung orientiert sich an Wu und Daniel (Daniel *et al.* 1997; Wu *et al.* 1996). Die Quervernetzungsprodukte wurden mit 10fachen molaren Überschuss pro Cys-Rest an 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoil-Säure in einem 0,2 M Tris/HCl Puffer (pH 8,0) mit 1 mM EDTA 0,5–1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 N NaOH wurde der pH-Wert der Lösung bis 9,5 erhöht. Darauf folgte weitere 17 h Inkubation.

3.7.4.5. *DNA-Spaltung mit Phosphodiesterasen*

Um die DNA in dem kovalenten Peptid-DNA-Komplex abzubauen, wurde die Peptid-DNA-Lösung mit 0,1 mg/ml PDE I und 0,2 U/ml PDE II üN bei 37 °C inkubiert. Vor den MALDI-MS-Untersuchungen wurden die Proben gegen 10 mM CH₃COO(NH₄) Puffer (pH 8,0) dialysiert oder mittels Reverse-Phase-Chromatographie in ZipTip_{C18} (Milipore, Eschborn) gereinigt.

3.7.5. *Untersuchung der Spaltungsprodukte mittels MALDI-MS*

MALDI-MS-Messungen (Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ -ionisations-Massenspektrometrie) wurden an einem Reflex III-Massenspektrometer (Bruker, Bremen) durchgeführt. Zur Aufnahme eines Massenspektrums wurde die Dünnschichtpräparation mit α -Hydroxycyanozimtsäure (HCCA) von drei verschiedene Proben (tryptische ABF1-Peptide, Trypsin-verdauter Peptid-DNA-Komplex, Trypsin- und Phosphodiesterase I/II-verdauter Peptid-DNA-Komplex) vorbereitet. Zur Entfernung von Alkaliionen, welche bei der Analyse von DNA-Proben stören, wurde die Probenplatte zuerst für 10 min mit 50 mM Diammoniumhydrogencitrat inkubiert. 0,5 µl Peptid- und Peptid-DNA-Lösung (ca. 1–0,5 µM) wurde mit 0,5 µl einer gesättigten Lösung von α -Hydroxycyanozimtsäure in 33 % Acetonitril / 0,1 % Trifluoressigsäure / 50 mM Diammoniumhydrogencitrat gemischt, und davon 0,5 µl auf die

Probenplatte aufgetragen. Die Messungen wurden im Reflektor-Positivionen-Modus durchgeführt. Die Zuordnung der Signale zu der entsprechenden Masse erfolgte mit Hilfe des Programms *FindPept* (www.expasy.ch).

4. Ergebnisse

4.1. Präparation von ABF1 und Analyse der ABF1-Multimerisierung

Für die vorliegenden Untersuchungen – Analyse der ABF1-DNA-Bindeigenschaften bzw. Proteinkomplexe und ABF1-Quervernetzungsexperimente mit DNA – wurde das ABF1-Protein in *E. coli* überexprimiert und nach dem modifizierten Reinigungsverfahren nach N. Dank (1997) isoliert. Wegen der Proteinalterung beim Lagern wurde die Reinigung des ABF1's von Zeit zu Zeit wiederholt, um den Anteil an denaturiertem ABF1-Protein möglichst gering zu halten.

4.1.1. Säulenchromatographische Reinigung des rekombinanten ABF1-Proteins

Die Überexpression des rekombinanten ABF1's erfolgte in *E. coli* Zellen über den Vektor pQE12-ABF1 (N. Dank, 1997), der den Einbau von sechs Histidinresten am C-Terminus des Proteins ermöglicht. Aus den induzierten Zellen wurde das ABF1-Protein mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Das Elutionsprofil des ABF1's mit Imidazol ist in Abb. 4-1 wiedergegeben. In der Hauptfraktion, die bei 125 mM Imidazol eluiert, waren Proteinabbauprodukte neben intaktem ABF1 enthalten.

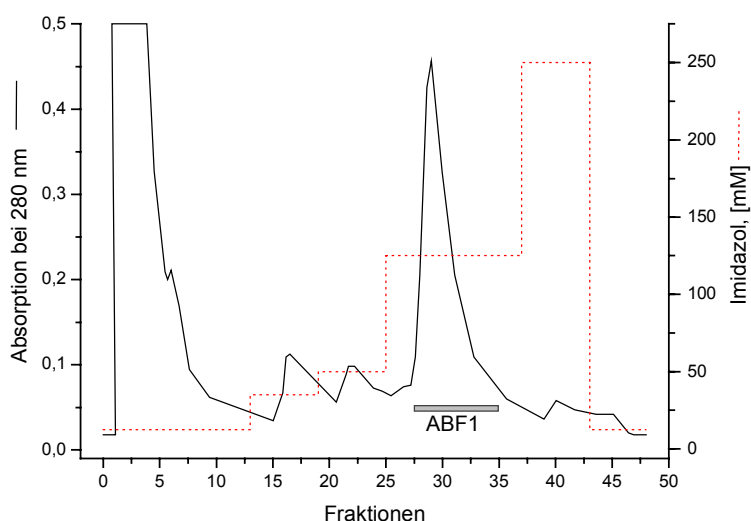


Abb. 4-1 Elutionsprofil des rekombinanten ABF1's während der FPLC-Reinigung an Ni²⁺-NTA-Agarose. Absorption bei 280 nm ist dargestellt; der Verlauf des Imidazolgradienten ist in das Diagramm eingezeichnet.

Um eine weitere Reinigungsmethode zu optimieren wurde ein kleiner Teil der vereinigten Fraktionen 27–34 des über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigten Proteins (Abb. 4-1) mit Auftragspuffer (20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl) verdünnt und auf eine Spinsäule mit SP-Sepharose aufgetragen. Die Proteinelution von dem Ionenaustauscher erfolgte mit stei-

gender Menge an NaCl. Die meisten Proteinfragmente binden nicht an der Säule oder wurden mit 200 mM NaCl ausgewaschen. Danach eluiert das ABF1-Protein bei einer Salzkonzentration von 300–500 mM (Abb. 4-2).

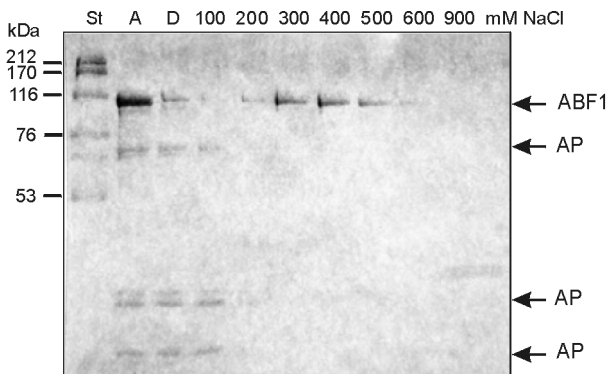


Abb. 4-2 SDS-PAGE der ABF1-Fractionen nach der Reinigung mittels einer SP-Sephrose-Spinsäule. Zur Elution wurden schrittweise je 100 μ l Auftragspuffer mit steigender Salzkonzentration zugegeben und je 10 μ l des Eluats auf das PAAG aufgetragen. A: Auftrag; D: Durchbruch; St: Molekulargewichtsstandard; AP: Proteinabbauprodukte.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die weitere Reinigung und Konzentrierung der vereinigten ABF1-Fractionen auf einer präparativen SP-Sephrose-Säule. Nach der Dialyse gegen Auftragspuffer wurden die Proteine auf die Säule aufgegeben. Nach dem Anlegen eines Stufengradienten konnte der größte Teil an bindeaktivem ABF1 mit 450 mM NaCl eluiert werden (Abb. 4-3).

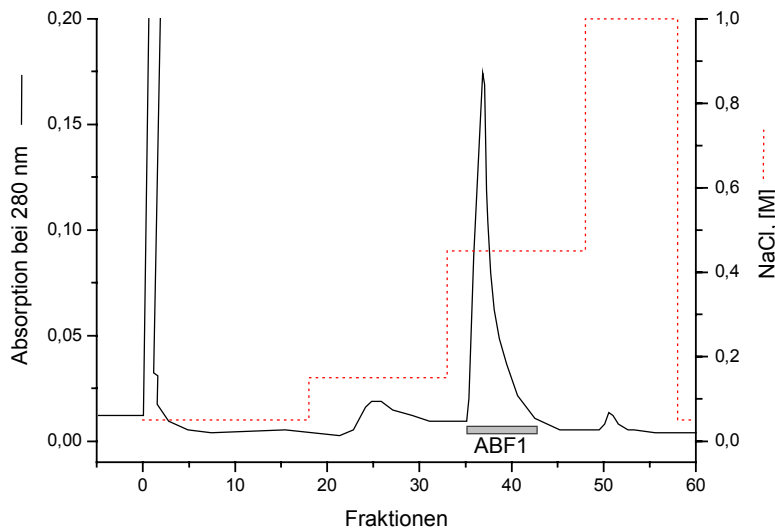


Abb. 4-3 Elutionsprofil des vorgereinigten rekombinanten ABF1's von SP-Sephrose. Absorption bei 280 nm und der Verlauf des NaCl-Gradienten ist dargestellt.

Die Kombination von Ni^{2+} -Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie (FPLC) erwies sich als ausreichend, um ein >90 % reines ABF1-Protein zu gewinnen. Das SDS-Gel nach Laemmli in Abb. 4-4 zeigt eine Anreicherung des ABF1's sowie eine Abtrennung der Abbauprodukte.

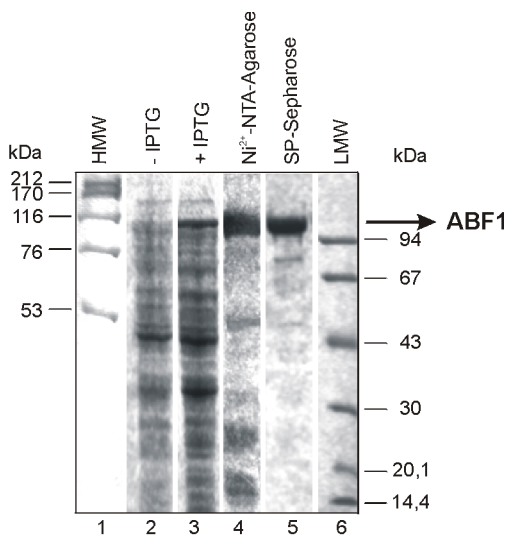


Abb. 4-4 SDS-Gel des rekombinanten ABF1-Proteins nach der Anreicherung mittels FPLC. Bahn 1 und 6: Molekulargewichtsstandard (HMW, LMW); Bahn 2: Zellaufschluss nicht induzierter und induzierter Zellen (Bahn 3); Bahn 4: Eluat von Ni²⁺-NTA-Agarose; Bahn 5: Eluat von SP-Sepharose.

4.1.2. Analyse der Dimerbildung des ABF1-Proteins

Für die geplanten Experimente war es wichtig, die Neigung des ABF1's zur Multimerisierung zu überprüfen. In einem nativen PAAG (Abb. 4-5) wurden die ABF1-ABF1-Komplexe schon bei einer Konzentration von 0,5 μM (10 pmol; Bahn 2) gebildet, bei einer Konzentration von 4 μM (80 pmol; Bahn 5) war das ABF1 zum größten Teil als ein Oligomer vorhanden. In Anwesenheit von ABF1-spezifischer DNA sind drei Komplexe (K1–K3) sichtbar (Bahn 6). Diese wurden den DNA-Komplexen mit ABF1-Monomeren, Dimeren und Trimeren zugeordnet.

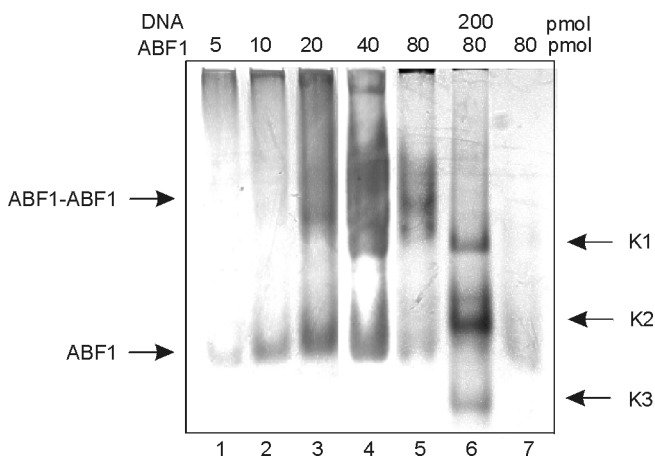


Abb. 4-5 Auftrennung der Proteinkomplexe in 6% nativem PAAG. K1–K3 entsprechen den ABF1–DNA-Komplexen in Bahn 6, Proteinmonomere und Dimere sind mit Pfeilen markiert. Bahn 1–4: Proteinfärbung mit Silber; Bahn 5–7: Coomassie-Färbung. Bahn 1–5: Proteinverdünnungsreihe in dem Bindungspuffer H01 mit 100 mM NaCl; Bahn 6: vor dem Auftrag wurde das ABF1-Protein mit Überschuss an 27 bp Oligonukleotid x15p/abf-Ts 10 min bei +4 °C in 20 μl Puffer H01 inkubiert; Bahn 7: denaturiertes ABF1 (2 min bei 95°C).

Die Protein-Behandlung mit Dimethylsuberimidat (DMS) erlaubt eine chemische Quervernetzung der Proteinmultimere (Abb. 4-6). Das ABF1-Protein erwies sich als instabil in Gegenwart von DMS (Bahn 2), was zu einer Entstehung von Abbauprodukten führte. Die Zugabe von ABF1-spezifischem, 27 bp langen ARS1-Element führt nicht nur zur Stabilisierung des Proteins, sondern auch zu einer Bildung von zwei ca. 175 kDa und über 220 kDa großen Komplexen (K1 und K2). Es ist nicht zu erwarten, dass die Entstehung des DNA-

Protein-Komplexes (17 kDa + 82 kDa) zu einer deutlichen Massenerhöhung führt. Die Banden sind eher als quervernetzte ABF1-Multimere zu deuten.

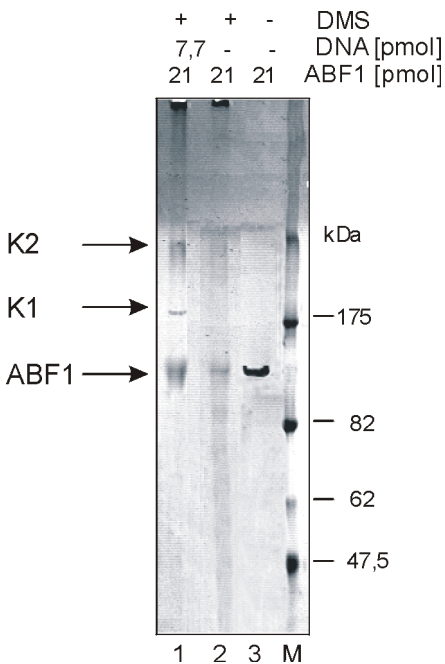


Abb. 4-6 Auftrennung der ABF1-Komplexe im 8% SDS-Gel nach der Behandlung mit DMS. K1- und K2-Komplexe entstehen nach der Zugabe von dsDNA zu ABF1 (Bahn 1). Das Protein wurde mit Coomassie visualisiert.

Nicht alle Bisimidate führen zu einer gleich starken chemischen Quervernetzung der Proteine. Durch eine Optimierung der Quervernetzungsbedingungen und die Verwendung von anderen chemischen Agenten wäre es wahrscheinlich möglich einen stabileren ABF1-Komplex zu erhalten. Aus den durchgeführten Experimenten konnte die Neigung des ABF1's, Multimere zu bilden, nachgewiesen werden.

4.1.3. Überexpression und Reinigung der ABF1-Domäne

In mehreren Transkriptionsfaktoren existieren separate DNA-Bindedomäne, die sich weitgehend unabhängig von anderen Teilen des Proteins falten können. Die Größe des ABF1's erschwert die ABF1-DNA-Komplexanalyse. Durch eine limitierende Spaltung mit Trypsin ließen sich einzelne stabile ABF1-Domänen identifizieren, die ein spezifisches DNA-Bindungsvermögen aufweisen (Abb. 4-37, Abb. 4-38). Von Interesse war es zu untersuchen, ob solche isolierten aktiven DNA-Bindedomäne existieren. Um eine mit DNA quervernetzte Aminosäure zu identifizieren, wäre es denkbar, nur eine überexprimierte ABF1-Domäne herzustellen und für weitere Untersuchungen zu verwenden. Die hergestellten Proteindomänen sind in der Abb. 4-7 gezeigt.

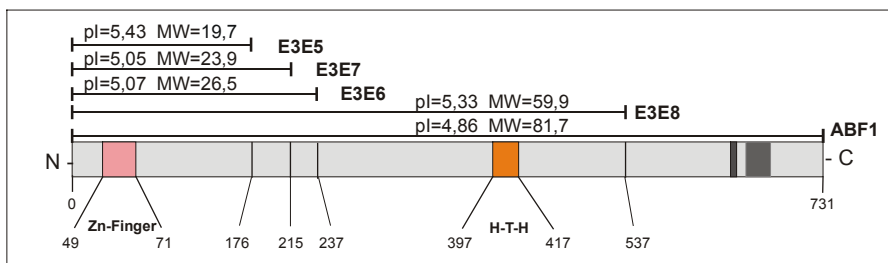


Abb. 4-7 Grafische Darstellung der überexprimierten ABF1-Domäne. Die Zahlen entsprechen der AS-Position; pI und MW (in kDa) des jeweiligen Peptides und des ABF1-Proteins wurde berechnet. Zinkfinger und Helix-Turn-Helix (H-T-H)-DNA-Bindemotive sind markiert. E3–E8 entsprechen der Bezeichnung der benutzen Primer.

Drei ABF1-Fragmente (176 AS, 215 AS, 237 AS), die ein Zink-Finger-DNA-Bindemotiv enthalten, wurden mittels PCR hergestellt und in den pQE12-Vektor kloniert. Nach der Se-

quenzierung des klonierten Abschnittes wurde die ABF1-Domäne in *E. coli* überexprimiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte unter nativen und denaturierenden (mit 8 M Harnstoff) Bedingungen mittels Ni^{2+} -NTA-Spinsäule (Qiagen, Hilden) (Abb. 4-8).

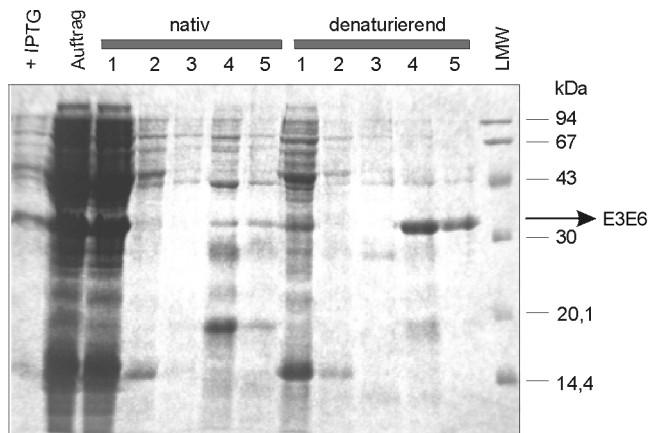


Abb. 4-8 12,6% Laemmli-Gel der nativen und denaturierenden Reinigung der ABF1-Domäne E3E6 mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. Aufschluss der induzierten Zellen (+ IPTG) und Zelllysate (Auftrag) sind dargestellt. Bahn 1: Durchbruch; Bahn 2, 3: Waschfraktionen; Bahn 4, 5: Eluat; LMW: Molekulargewichtsstandard.

Das am C-Terminus eingefügte HisTaq wurde anscheinend nicht auf der Proteinoberfläche exponiert, weshalb das E3E6-Protein nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden konnte. Das rekombinante E3E5- bzw. E3E7-Protein besitzt ebenfalls keine nachweisbaren DNA-Bindungseigenschaften. Die Proteinfaltung verläuft wahrscheinlich durch eine Verkürzung des Proteins anders, als bei nativem ABF1. Eine Herstellung des ca. 60 kDa großen E3E8-Proteins, das beide DNA-Bindedomäne beinhaltet, verlief erfolgreich, wobei eine niedrigere Bindungsaktivität des verkürzten Proteins im Vergleich mit dem wt ABF1 beobachtet wurde. Daraus konnte nichts über die Eigenschaften der einzelnen DNA-Bindedomäne abgeleitet werden. Aufgrund der niedrigeren Bindungsaktivität erschien es nicht sinnvoll, das Protein E3E8 in die Quervernetzungsexperimente einzusetzen.

4.2. DNA-Bindungseigenschaften von ABF1

4.2.1. Untersuchung der ABF1-Bindesequenz mittels DNA-SELEX

In der Literatur sind mehrere DNA-Sequenzen beschrieben, an die das ABF1-Protein spezifisch bindet. Die Sequenzen sind nicht nur in Promotorregionen oder in verschiedenen ARS's zu finden, wie es bei einem Transkriptionsfaktor und Replikationsaktivator zu erwarten wäre, sondern auch in den Telomeren und in *Gensilencing*-Sequenzen. Aus der großen Zahl und Vielfalt der Bindesequenzen lässt sich ein Konsensus-Erkennungsmotiv 5'-RTCRYNNNNACG -3' bilden (Halfter *et al.* 1989a) (Dorsman *et al.* 1991). Um das Konsensusmotiv besser zu charakterisieren, die Erkennungssequenz einzuschränken und die am stärksten bindenden DNA-Moleküle zu identifizieren, wurde ein DNA-Selektionsexperiment *in vitro* durchgeführt. Die Strategie der durchgeführten Selektion und eine schematische Darstellung der vorgenommenen Sequenzanalyse ist in Abb. 4-9 dargestellt.

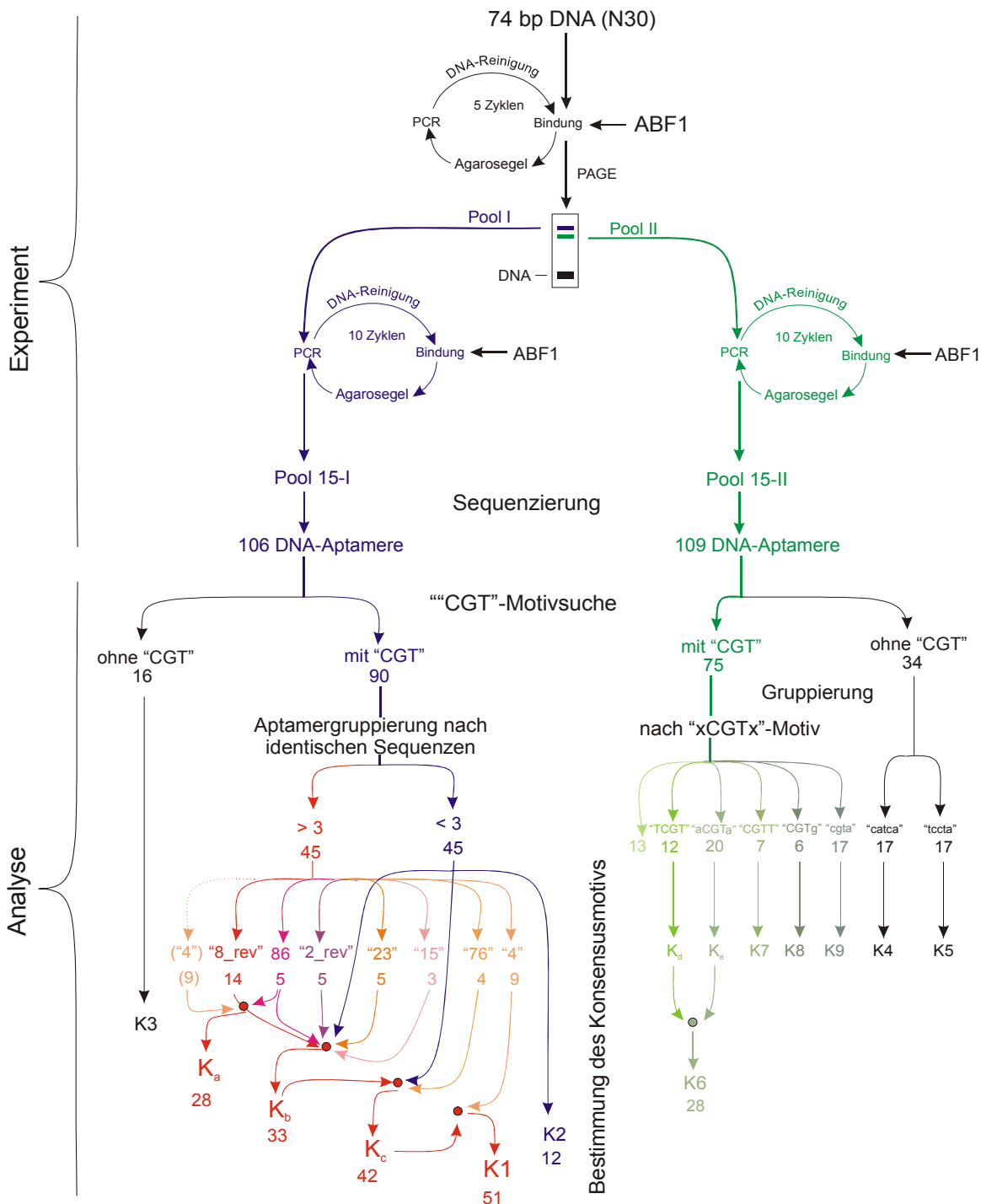


Abb. 4-9 Strategie der durchgeführten DNA-Selektion und der Bildung von Konsensusmotiven. Die Zahlen entsprechen der Menge der analysierten Aptamere; repräsentative Sequenzen der Gruppe wie „8_rev“, „86“, bzw. Motive wie „TCGT“ etc. sind dargestellt. Hochkonservierte Nucleotide sind in Großbuchstaben geschrieben. K: Konsensusmotiv

4.2.1.1. Bestimmung der DNA-Bindesequenz *in vitro*

Ein randomisierter, 74 bp langer DNA-Pool mit 30 variablen Basenpaaren in der Oligonukleotidmitte wurde für die Bindungsexperimente mit dem ABF1 eingesetzt. Steigende Konzentrationen von ABF1 wurde mit der P³²-markierten DNA (3.4.2) inkubiert und in einem Agarosegel (3.2.1) aufgetrennt. In den ersten 4–5 Zyklen konnte kein ansteigender DNA-Bindungsverlauf erkannt werden, nur mit ca. 10fachen

DNA-Bindungskurvenverlauf erkannt werden, nur mit ca. 10fachen Überschuss an Protein war es möglich, eine Bindung zu identifizieren (Abb. 4-10).

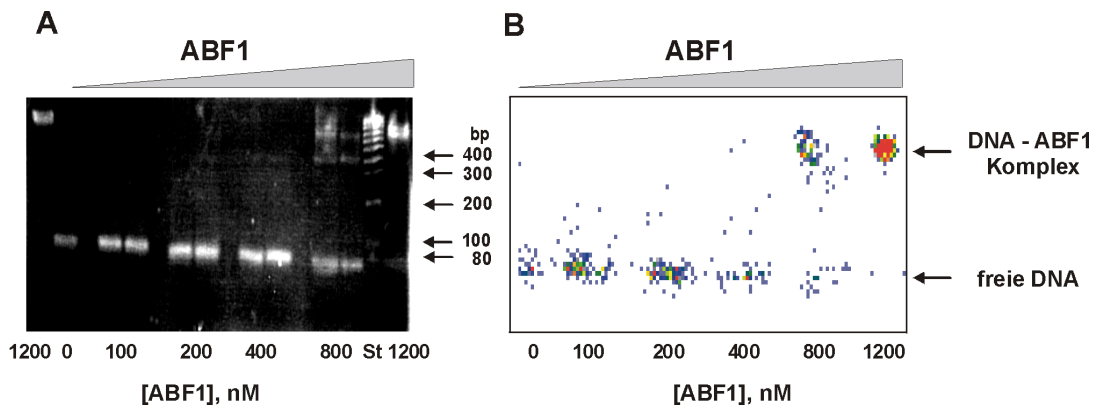


Abb. 4-10 ABF1-DNA-Bindungsverlauf im dritten SELEX-Zyklus. 100 nM DNA wurden in einem HOO5-Puffer mit 100 mM NaCl und Überschuss an ABF1 10 min inkubiert und in einem 2,5 % LMP-Agarosegel aufgetrennt. (A) DNA-Visualisierung durch Ethidiumbromidfärbung; (B) Detektion der radioaktiven DNA-Fragmente. St: DNA-Standard.

Die mit 4fachem Proteinüberschuss gebundene DNA wurde für den weiteren Selektionschritt aus dem Gel ausgeschnitten und direkt in der PCR eingesetzt (3.4.4.2). Nach der Ethidiumbromidfärbung (A) war deutlich zu sehen, dass bei einer Proteinkonzentration von 800 nM zwei Protein-DNA-Komplexe gebildet wurden, die als eine radioaktive Bande im Autoradiogramm (B) zu sehen waren. Dies war der Grund, nach dem fünften Bindungszyklus den Bindungsansatz auf ein Polyacrylamidgel aufzutragen, um eine längere Trennstrecke auszunutzen und beide Komplexe besser voneinander zu trennen (Abb. 4-11).

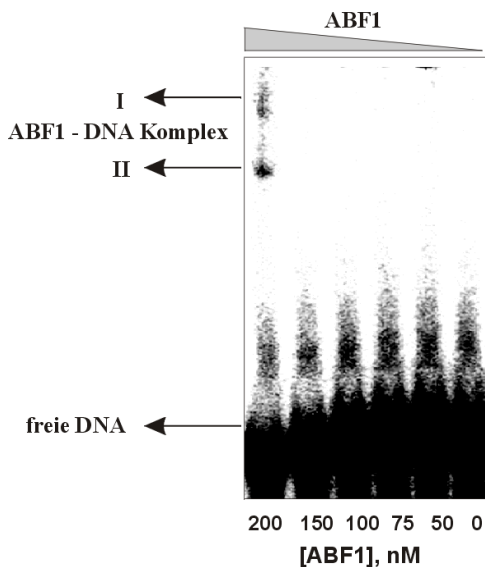


Abb. 4-11 Auftrennung der ABF1-DNA-Komplexe nach dem fünften SELEX-Zyklus. 10 nM DNA wurden in einem Puffer HOO5 mit 100 mM NaCl und Überschuss an ABF1 10 min inkubiert und in einem 5 % PAAG in 0,5x TBE-Puffer 2,5 h bei 200 V und +4 °C aufgetrennt. Detektion der radioaktiven DNA-Fragmente erfolgte im Instantlmager.

Aus dem PAAG wurden beide DNA-ABF1-Banden isoliert (3.3.3) und für weitere Selektionsrunden parallel eingesetzt. So entstanden zwei DNA-Pools, die als Pool I und Pool II bezeichnet wurden. Um die Spezifität der Selektion zu erhöhen wurde die Salzkonzentration ab dem 10. Zyklus auf 200 mM, im 13. auf 300 mM, ab dem 14. auf 350 mM NaCl erhöht. Nach jedem Bindungszyklus wurden die selektierten DNA-Pools verglichen, indem die gleiche Menge an DNA aus vorhergehenden Selektionsrunden mit ABF1 inkubiert und auf einem PAAG aufgetrennt wurde. Als positive Kontrolle diente ein ABF1-spezifisches 74 bp ARS1-Fragment, das mittels PCR gewonnen wurde. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in der Abb. 4-12 dargestellt.

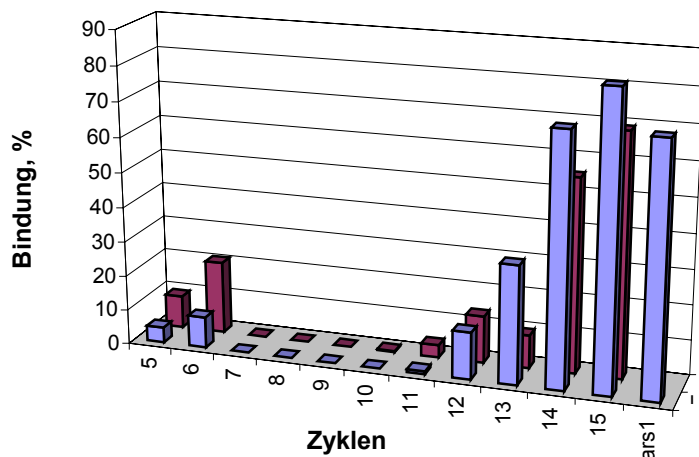


Abb. 4-12 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Gelretardationsexperiment nach verschiedenen SELEX-Zyklen. 100 nM ABF1 wurde mit 10 nM DNA inkubiert und während EMSA aufgetrennt. Erster DNA-Pool (I) ist in hell, zweiter (II) in dunkel dargestellt; als Kontrolle wurde ein 74 bp langes PCR-Produkt aus dem ARS1-Element eingesetzt.

Die DNA-Bindungsausbeute von beiden DNA-Pools war nach dem 15. Zyklus mit einer 74 bp langen Sequenz aus ARS1 (3.4.4.4) vergleichbar, wobei der DNA-Pool I höhere Spezifität zeigte. Deshalb wurde die DNA aus beiden Pools nach dem 15. Zyklus mittels PCR (3.4.4.2) vermehrt, nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen (3.4.1) und anschließender Reinigung (3.3.4) in das Plasmid pUC19 ligiert (3.4.3) und in *E. coli* *XL1 Blue* transformiert (3.1.6). Aus jeder einzelnen Zellkolonie (3.1.5) wurde eine üN Kultur in 5–8 ml LB-Medium angesetzt. Um sicher zu sein, dass die Zellen ein Insert der richtigen Länge in dem Plasmid enthalten, wurde eine PCR mit Zelllysat durchgeführt (3.4.4.1). Danach wurden die DNA-Fragmente in einem 2–3 % Agarosegel getrennt und analysiert. 106 Plasmide, die das DNA-Insert aus dem Pool I besitzen und 109 Plasmide, mit dem Insert aus dem Pool II, wurden isoliert und bei der Fa. „SeqLab“ (Göttingen) sequenziert.

4.2.1.2. Vergleich der DNA-Bindesequenzen und Bestimmung des Konsensusmotivs für die ABF1-Bindung

Die aus den DNA-Sequenzierungsdaten ermittelten 30 bp langen Sequenzen wurden mit dem „GCG“-Programm analysiert. Mittels des „MultAlin“-Programms (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) wurden die Konsensusmotive nach dem „DNA-1-5“- bzw. „Identity-1-0“-Algorithmus bestimmt (Abb. 4-9). Um den Vergleich der Aptamersequenzen zu erleichtern, wurde als erster Schritt eine Sequenzzuordnung in Gruppen vorgenommen, wobei beide DNA-Stränge in Betracht gezogen wurden. dsDNA-Sequenz 5'- CGTnnrrryGAy -3' wurde als Erkennungsmotiv für das ABF1-Protein aus *S. cerevisiae* beschrieben (Dorsman *et al.* 1991; Halfter *et al.* 1989a). Aufgrund dieser Literaturdaten wurden zunächst die Sequenzen ohne „CGT“-Motiv einer Gruppe, die keine spezifischen Erkennungssequenzen enthält, zugewiesen. In dem DNA-Pool 15-II machen solche unspezifische Aptamere 15 % aller sequenzierten DNA (16 Oligonukleotide aus 106) aus, der DNA-Pool 15-I besteht aus 31 % (34 Sequenzen aus 109) solcher Sequenzen. In dem DNA-Pool 15-I wurden 7 Aptamergruppen, die zwischen 3 und 14 identische Sequenzen beinhalten und ca. 50 % der gesamten Aptamere betragen, identifiziert. Das ist ein

Hinweis dafür, dass der Pool 15-I, der einen langsam wandernden DNA-Proteinkomplex bildete und unabhängig von dem schnell wandernden Komplex II selektiert wurde (Abb. 4-11), deutlich spezifischer ist, als Pool 15-II, der kaum identische Aptamere beinhaltet. Zuerst wurden drei DNA-Gruppen „4“, „8_rev“ und „86“ aus dem Pool I miteinander verglichen und ein Konsensusmotiv K_a (Abb. 4-9) bestimmt. Gruppe „4“ wurde aufgrund des starken Einflusses auf die folgende Gruppierung aus dem anschließenden Alignment der „8_rev“, „86“, „2_rev“, „23“ und „15“ Gruppen entfernt (Abb. 4-13) und im letzten Schritt (Bestimmung des Konsensus K_1) wieder einbezogen. Darauf folgte eine Erweiterung der Analyse mit nach und nach zugefügten Aptamergruppen („76“ und „4“) und schließlich einzelnen Sequenzen (Abb. 4-14). Bei den Sequenzen, bei denen sich das voraussichtliche ABF1-Bindemotiv direkt an der Primersequenz befindet, wurden auch die Primersequenzen in das *Alignment* einbezogen. Die DNA-Aptamergruppe „4“ fällt, trotz der enthaltenen ABF1-Bindemotive, aus dem gesamten Alignment heraus. Die Sequenzen aus jeder Gruppe wurden in EMSA bezüglich ihrer ABF1-Bindung untersucht (4.2.2.1).

	1	10	20	30	40	50	55
	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
2_rev			TTACCGT	GATG	TGAT	ATGCAT	CCACCGTG
55_rev			TTACCGT	GATG	TGAT	ATGCAT	CCACCGTCTGAATCCTCCTA
163_rev			TTACCGT	GATG	TGAT	ATGCAT	CCACCGT
198_rev			TTACCGT	GATG	TGAT	ATGCACCCACCGT	
107a_rev			TTACCGG	CGATG	TATAT	ATGCAT	CCACCGT
165b_rev			TGACCT	GAGCGT	ACTG	ATACAT	CCCCCTA
86			TGTAT	CGTAT	TTGGT	GATGT	TTGGTGTTC
108			TGTAT	CGTAT	TTGGT	GATGT	TTGGTGTTC
264			TGTAT	CGTAT	TTGGT	GATGT	TTGGTGTTC
263			TGTAT	CGTAT	TTGGT	GATGT	TTGGTGTTC
170			TGTAT	CGTACT	TTGGT	GATGT	TTGGTGTTC
15	ACATGTGAT	GATAT	TATCGT	GTCTCGT	GATAGC	ARGCTT	GGA
18	ACATGTGAT	GATAT	TATCGT	GTCTCGT	GATAGC	ARGCTT	GGA
62	ACATGTGAT	GATAT	TATCGT	GTCTCGT	GATAGC	ARGCTT	GGA
23			CGTGT	CGTAT	TGAGT	GATAT	GATGCACATA
251			CGTGT	CGTAT	TGAGT	GATAT	GATGCACATA
228			CGTGT	CGTAT	TGAGT	GATAT	GATGCACATA
185a			CGCGT	CGTAT	TGATT	GATAT	GATCCACATA
230			CGTGT	CGTAT	TGAGT	GTAT	GTTGCACATTT
8_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
204_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
208_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
234_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
159_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
248_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
156_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
151_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
64_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
295_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
216_rev	CCACTGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
71_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
81_rev	CACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
250_rev	CCACAGTACT	TACCGT	TAA	ACATGAT	GT	C	AA
Consensusg....	TacCGT	at..	caTGAT	gt..	aa.....	

Abb. 4-13 Bestimmung des Konsensusmotivs K_b aus 5 Aptamergruppen von dsDNA-Pool 15-I. Die Analyse erfolgte mit „MultAlin“-Programm; hoch konservierte Bereiche sind rot dargestellt und entsprechen 90 % Ähnlichkeit, blau markierte Nukleotide kommen zu 50 % vor. (Die Zahlen neben den Sequenzen entsprechen der Oligonukleotidbezeichnung, rev steht für reverse Strang).

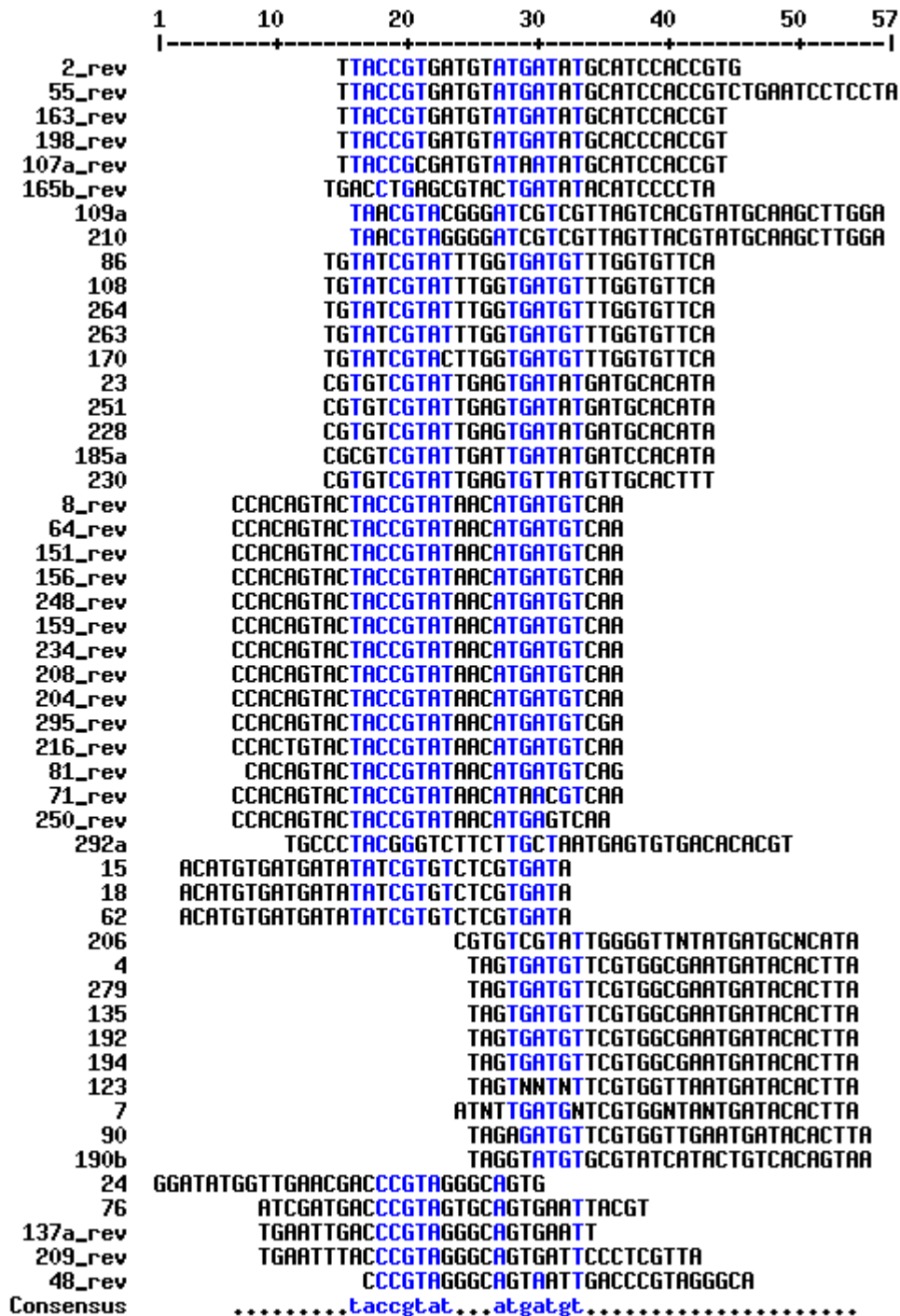


Abb. 4-14 Bestimmung des Konsensusmotivs im 15-I dsDNA-Pool. Die Analyse erfolgte mit „Multalin“-Programm; blau markierte Nukleotide kommen zu 50 % vor. (Die Zahlen neben den Sequenzen entsprechen der Aptamerbezeichnung, rev steht für reverse Strang).

Im Aptamer-Pool 15-I wurden 60–88 Basen lange palindromische ssDNA-Sequenzen nach der Plasmidsequenzierung identifiziert, die sich selbst komplementär sind und eine dsDNA bilden können (Abb. 4-15). Solche Aptamere sind wahrscheinlich durch PCR oder Ligation von dsDNA entstanden. Ein Teil der langen DNA (bis 90 bp), die eine oder beide Primersequenzen enthält, wurde während der fehlerhaften Restriktions-Ligations-Reaktion gebildet.

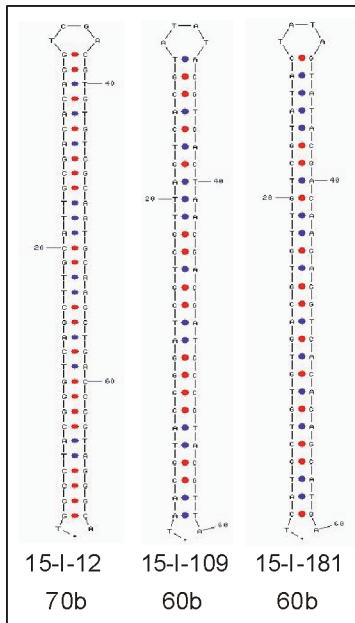


Abb. 4-15 DNA-Palindrombildung im Aptamerpool 15-I. ssDNA-Länge ist in Basen angegeben; die Sekundärstruktur der 12-, 109-, 181-ssDNA-Aptamere wurde mit Programm „mfold 3.0 Zuker&Turner“ (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/dna/form1.cgi>) modelliert.

Wie bereits ausgeführt, wurde im 15-II Pool keine große Anzahl von identischen Sequenzen gefunden. Deswegen wurde versucht, einzelne Aptamere zuerst in kleine Gruppen nach einem „xCGTx“-Motiv zu sortieren. Für die Konsensusmotivbestimmung wurde die für die Berechnung erlaubte Identität der einzelnen Nukleotide in jeder Position der DNA-Sequenz aufgrund der niedrigen Anzahl an Aptamere in der Gruppe auf 80 % gesenkt. Auf dieser Weise konnten die Konsensusmotive K_d , K_e und K_7 – K_9 für fünf Gruppen „aCGTa“, „TCGT“, „CGTT“, „CGTg“ und „cgta“ aus jeweils 20 (Abb. 4-16, A), 12 (B), 7 (C), 6 (D) und 17 Aptameren bestimmt werden. Aus den 28 Aptameren, die zu den Gruppen „aCGTa“ und „TCGT“ gehören, wurde ein Konsensusmotiv K_6 gebildet. Für die restlichen 13 Aptamere mit „CGT“-Motiv, deren Sequenz zu keiner Gruppe passte, wurde kein Konsensusmotiv bestimmt. Die 34 übrigen Sequenzen aus dem Pool 15-II, die kein „CGT“-Motiv besitzen, wurden in zwei Gruppen nach den Motiven „catca“ und „tccta“ geordnet. Aptamere, die das „CGT“-Motiv nur am Sequenzende und kein $CGTN_7GA$ Motiv bzw. keine Ähnlichkeit zu den anderen DNA-Gruppen aufweisen, wurden, ebensowie die DNA-Palindrome, als unspezifische DNA-Sequenzen betrachtet. Vor allem weist diese Aptamergruppe, bestehend aus einzelnen Sequenzen, keine Homologie innerhalb der Gruppe auf. Es handelt sich hier um die aus dem Ausgangspool gebliebenen unspezifischen Sequenzen.

Die berechneten Konsensusmotive von Pool 15-II zeigen eine große Variabilität, weshalb die Analyse nur in kleinen Gruppen möglich war. Identifizierte Konsensussequenzen sind in Tabelle 4-1 mit einander verglichen. Der DNA-Pool 15-I weist dagegen eine große Homogenität auf und lässt – im Vergleich mit dem bis jetzt in der Literatur beschriebenen 5'-CGTnnrrrryGay-3' Motiv – ein deutlich spezifischeres Konsensusmotiv 5'-taccgtatnntatgatgt-3' in 51 Sequenzen erkennen.

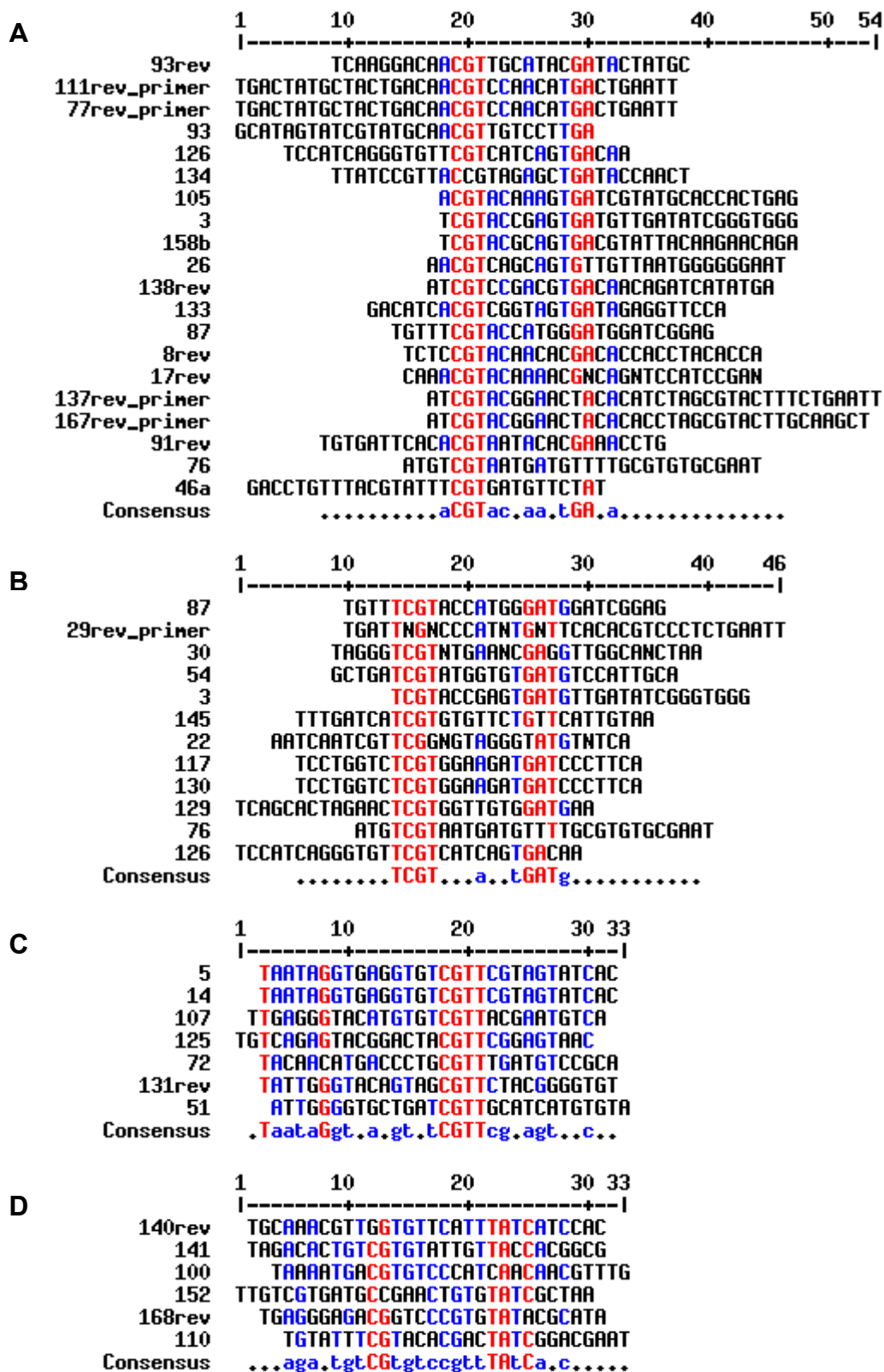


Abb. 4-16 Eingliederung der Aptamere aus dem dsDNA-Pool 15-II in die Gruppen. A: „aCGTa“-Gruppe; B: „TCGT“-Gruppe; C: „CGTT“-Gruppe; D: „CGTg“-Gruppe. Die Analyse erfolgte mit dem „MultAlin“-Programm; zu 80 % identische Bereiche sind rot markiert; blau dargestellte Nukleotide kommen zu 50 % vor. (Die Zahlen neben den Sequenzen entsprechen der Oligonukleotidbezeichnung, rev steht für reverse Strang).

Aus jeder Gruppe wurden 1–2 repräsentative Aptamere für die Gelretardationsexperimente und dem anschließenden Vergleich mit der genomischen *S. cerevisiae* DNA ausgesucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 und Anhang 8.1 präsentiert.

Die während der DNA-Selektion *in vitro* bestimmten Konsensusmotive (13 bp lang) sind im Genom von *S. cerevisiae* wiederzufinden. Das zeigt, dass die Selektion mit DNA N15 statt N30 – wie im analysierten Fall – ausreichend für eine ABF1-Konsensusmotivbestimmung wäre.

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der bestimmten ABF1-Konsensusmotive nach der SELEX. Pool 15-I bestand insgesamt aus 106, Pool 15-II – aus 109 DNA-Aptameren; hoch konservierte Bereiche (80–90 %) sind in großen Buchstaben, zu 50 % identische in kleinen Buchstaben dargestellt; Punkte entsprechen einer variablen Stelle in der Sequenz. Die Bezeichnungen entsprechen denen in Abb. 4-9.

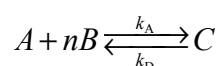
DNA-Pool und Konsensusmotiv oder Gruppe	Zahl der verglichenen Sequenzen	Konsensusmotiv
15-I__K _a	27	t..tatcGTatt...tGatGt...a.t
15-I__K _b	33	g...TacCGTat...caTGATgt..aa
15-I__K _c	42	TacCGTat...catgat.taa
15-I__K1	51	Taccgtat...atgatgt
15-I__cgta	12	gtgtttcgta.tt....a...tt.g
15-II__TCGT	12	TCGT...a...tGATg
15-II__aCGTa	20	aCGTaa...aa.tGA.a
15-II__CGTT	7	TaataGgt.a.gt.tCGTTcg.agt...c
15-II__CGTg	6	aga.tgtCGtgtccgttTAtCa.c
15-II__cgta	17	a...c...cgta...t
Literatur		CGTnnnrrryGay

Während des dargestellten DNA-Selektionsverfahrens wurde das DNA-Bindungs- und Erkennungskonsensusmotiv für das ABF1-Protein eingeschränkt und war im *S. cerevisiae* Genom wiederzufinden.

4.2.2. Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen DNA und ABF1

4.2.2.1. K_D -Bestimmung für Oligonukleotide nach SELEX

Nach der Bestimmung verschiedener DNA-Konsensusmotive im SELEX-Verfahren, war es wichtig zu untersuchen, mit welcher Affinität die isolierten Aptamere von ABF1 *in vitro* gebunden werden. Dazu wurden Gelretardationsexperimente nach 3.6.1 durchgeführt. Nach der Anteilbestimmung der gebundenen DNA im DNA-Proteinkomplex wurden die apparenten Bindungskonstanten nach der Hill-Gleichung aus der Bindungskurve mit *Origin-Software* berechnet. In der Reaktion zwischen DNA (*A*) und Protein (*B*)



gilt für die Gleichgewichtskonstanten unter Annahme einer kooperativen Bindung:

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_D}{k_A} = \frac{[A]_{\text{eq}} \cdot [B]_{\text{eq}}^n}{[C]_{\text{eq}}}$$

Während der Gelretardationsexperimente gilt $[B]_t = [B]_0$. Experimentell wird die Bindungskurve $[C]_{\text{eq}}/[A]_0$ vs. AusgangsproteinKonzentration $[B]_0$ gebildet. So ist die Hill-Gleichung umzuschreiben:

$$\frac{[C]_{\text{eq}}}{[A]_0} = \frac{[B]_0^n}{[B]_0^n + K_D} \quad \text{Gl. 4-1}$$

n ist hier der Hill-Koeffizient, K_D bezeichnet die Hill-Konstante (=Dissoziations- / Gleichgewichtskonstante).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4-2 zusammengefasst. Als positive Kontrolle diente eine 27 bp lange ARS1-Sequenz, die mit einer K_D von 1,4 nM von ABF1 gebunden wird.

Tabelle 4-2 K_D -Werte für die ABF1-Aptamer-Bindung. Die Bindungsversuche erfolgten in einem H005-Puffer. Konservierte Nukleotide im ABF1-Erkennungsmotiv CGT_nGA sind dunkel gezeichnet; Die Anzahl der identischen DNA-Sequenzen wurde auf die gesamte Sequenzzahl im sequenzierten DNA-Pool bezogen; DNA-Bindungskonstanten wurden nach der Michaelis-Menten- bzw. Hill-Gleichung berechnet; n_{Hill} = Hill-Konstante; die ARS1-Sequenz wurde zum Vergleich angegeben.

A Sequenzen aus dem DNA-Pool 15-I

Gruppe/Sequenzbezeichnung	Anteil im Pool [%]	Sequenz	K_D [nM]
8_rev	13,2	CCACAGTACTAC CGT TATAACAT GAT GTCAA	0,06 ± 0,01
4	8,5	TAGTGATGTT CGT GGCGAAT GAT ACTACTTA	0,44 ± 0,11
ARS1		GCAAATTT CGT CAAAAAT GAT AAGAAAC	1,4 ± 0,1
86	4,7	TGTAT CGT ATTTGGT GAT GTTTGGTGTTC	1,8 ± 0,2
15	2,8	ACATGTGATGATATAT CGT GTCTCGT GAT A	2,4 ± 0,4
23	5,7	CGT GT CGT ATTT GAT GATATGATGCACATA	4,1 ± 0,6
210_rev	1,9	ATAC CGT TAACTAAC GAT CGATCCCCTACGTTA	4,7 ± 1,1
2_rev	4,7	TTAC CGT GATGTAT GAT ATGCATCCACCGTG	10,8 ± 1,5
76	4,7	ATCGATGACCC CGT AGTGCAGT GAT AATTACGT	250,8 ± 9,8

B Sequenzen aus dem 15-II DNA-Pool

Sequenzbezeichnung	Sequenz	K_D [nM]
ARS1	GCAAATTT CGT CAAAAAT GAT AAGAAAC	1,4 ± 0,1
130	TCCTGGTCT CGT GGAAGAT GAT CCCCTTCA	5,13 ± 2,35
54	GCTGAT CGT ATGGTGT GAT GTCCATTGCA	7,22 ± 0,78

Sequenzbezeichnung	Sequenz	K_D [nM]
17	CAAAC CGT TACAAAAC GA CAGATCCATCCGA	13,1 ± 1,1
141	AGACACTGT CGT GTATTGTT ACC ACGGCG	18,9 ± 7,0
133	ACATCA CGT CGGTAGT GA TAGAGGTTCCA	77,7 ± 9,1
14	AATAGGTGAGGTGT CGT TCGT AGTATCAC	863 ± 28,6

Durch ein Nukleotidinsert in der Sequenzmitte vom CGT_n -GA-Motiv wurde die Bindung mindestens 10fach geschwächt (Aptamer 76 aus dem dsDNA-Pool 15-I). Obwohl ein Basenaustausch (TA statt GA) in dem Erkennungsmotiv von Aptamer 141 aus dem 15-II dsDNA-Pool keine deutliche Wirkung auf die Bindungskonstante zeigt, sind alleine die CGT-Nukleotide nicht ausreichend für eine spezifische Bindung mit ABF1 (Aptamer 14 im Pool 15-II). Eine Hälfte der selektierten Aptamere im Pool 15-I besteht aus identischen Sequenzen, die in 7 Gruppen eingeteilt wurden. Im Vergleich mit dem ARS1-Element weisen die Aptamere 4 und 8 aus den zwei größten Gruppen eine bis zu 15fach höhere Affinität zum Protein auf (Abb. 4-17). Aptamer 210 kommt zwar nur zweimal im gesamten Pool vor, besitzt aber recht hohe Bindungsaffinität (4,7 nM), weshalb es nicht auszuschließen ist, dass es in weiteren SELEX-Runden zur Anreicherung solcher Sequenzen kommen könnte.

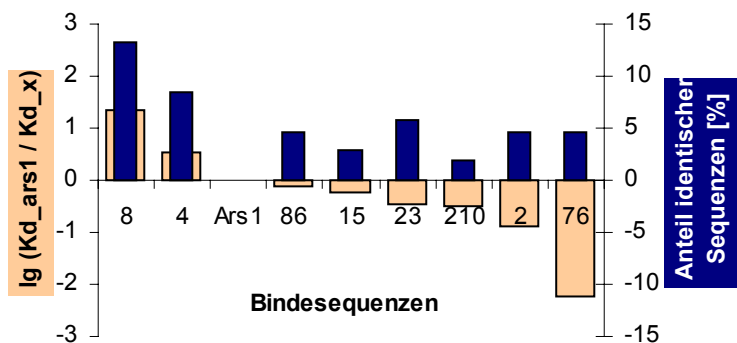


Abb. 4-17 Zusammenhang zwischen der Aptamer-Bindungsaffinität und des Anteils von identischen Sequenzen im Pool 15-I. Der prozentuale Anteil der identischen Aptamere ist dunkel dargestellt; 27 bp lange ARS1-DNA wurde als positive Kontrolle verwendet; die Bindungsaffinitätsdaten sind hell dargestellt.

Als Beweis dafür, dass die ABF1-Bindung an die DNA-Aptamere während der Selektion im variablen N30-Bereich stattgefunden hat, dienten zwei 23 bp lange Oligonukleotide, die Primersequenzen aus dem 74 bp langen DNA-Selektionspool (N30) enthalten. Diese im EMSA getestete DNA führte zu keinem nachweisbaren Bindungsereignis mit ABF1-Protein. Die meisten während der DNA-Selektion *in vitro* isolierten, ABF1-spezifischen Aptamere erwiesen sich als hochaffine Bindungspartner des ABF1-Proteins in EMSA-Experimenten. Zwei Aptamere 8_rev und 4, die im DNA-Pool 15-I am häufigsten vorhanden waren, zeigten bis zu 15fach stärkere ABF1-Bindung im Vergleich mit dem ARS1-Element. Das DNA-Konsensusmotiv des ABF1-Proteins (TAC**CGT**ATNNNAT**GAT**GT), das aus 51 Sequenzen des Pools 15-I gebildet wurde, lässt das bis jetzt aus der Literatur bekannte Erkennungs-

motiv CGTNNNNRRYGAY erweitern. Die Isolierung von hochaffinen DNA-Aptameren, die in *S. cerevisiae* Genom wiederzufinden sind, und die Charakterisierung des ABF1-Erkennungsmotivs stellt das Ergebnis der erfolgreich durchgeführten Selektion *in vitro* dar.

4.2.2.2. Analyse der ABF1-Bindungseigenschaften mit ARS-Elementen und Promotorsequenzen

Die Variabilität in den DNA-Bindungssequenzen, die Streuung der K_D -Werte für die *in vitro* selektierten Aptamere und die große Anzahl der potenziellen ABF1-Bindungsstellen im Genom von *S. cerevisiae* wirft die Frage auf, nach welchen Kriterien die DNA erkannt und gebunden wird. Ein Zusammenhang zwischen der Länge der DNA-Bindungssequenzen, dem Einfluss der variablen Nukleotide im ABF1-Erkennungsmotiv, der Anwesenheit mehrerer Bindemotive auf einer genomischen Region und der Stärke der ABF1-Bindung war bis jetzt nicht ausführlich untersucht. Um die Wechselwirkung des ABF1 mit den in *S. cerevisiae* vorkommenden ABF1-spezifischen DNA-Sequenzen zu untersuchen, wurden Bindungsexperimente mit 27–41 bp langen Oligonukleotiden, die aus verschiedenen ARS-Elementen (ARS1, ARS120, ARS121, ARS1501) und Sequenzen aus den Promotorregionen der *his7*-, *ded1*-, *rpo31*- und *ypt1*-Gene abgeleitet wurden, durchgeführt. Die Auswahl der Sequenzen beruhte auf den Literaturdaten. Es wurde darauf geachtet, dass die ausgewählte DNA ein breites Spektrum der möglichen Bindemotive auf beiden DNA-Strängen enthält und verschiedene Nukleotide im variablen Bereich des Erkennungsmotivs CGTN₇GA beinhaltet. So wurde die ABF1-Wechselwirkung mit dem Mikrosatellit (GA)₉ (*his7*-Promotorregion), mit den Sequenzen der Promotorregionen, deren sich mehrfach wiederholende Erkennungsmotive direkt neben einander liegen (*rpo31*) oder sich überlappen (*ded1*, *ypt1*), aber auch weiter voneinander entfernt in der ARS-Region (ARS121, ARS1501) vorkommen, analysiert. Diese wurden mit den veränderten Oligonukleotiden verglichen, die weniger Erkennungsmotive enthalten oder kein Motiv besitzen (Tabelle 4-5). Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten wurde die Menge an ABF1 variiert, die Konzentration der radioaktiv markierten DNA blieb dagegen konstant. Falls mehrere ABF1-Erkennungsmotive in einer DNA vorhanden waren, wie z. B. im *ypt1/TUB2*-Promotor, der zwei Motive enthält und dessen Transkription in einer richtungsabhängigen Weise aktiviert wird (Halfter *et al.* 1989b), wurde eine Auswertung der Bindungskurven nach der Hill-Gleichung vorgenommen. Wie am Beispiel von Oligonukleotid *ypt1* dargestellt ist (Abb. 4-18), zeigt das ABF1-Protein eine positive Kooperativität der Bindung mit DNA ($n_{\text{Hill}} = 2,5$). Mit der Erhöhung der ABF1-Konzentration entsteht ein langsam wandernder DNA-ABF1-Komplex, der wahrscheinlich zwei gebundene Proteinmoleküle trägt.

Durch die Bestimmung und den Vergleich der apparenten K_D der ABF1-DNA-Bindung wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Analyse der optimalen DNA-Sequenzlänge, Einfluss der Überlappung der Erkennungsmotive, Einfluss der DNA-Inversion und der nicht-

konservierten Nukleotide in dem Erkennungsmotiv CGTN₇GA auf die ABF1-Bindungsaffinität.

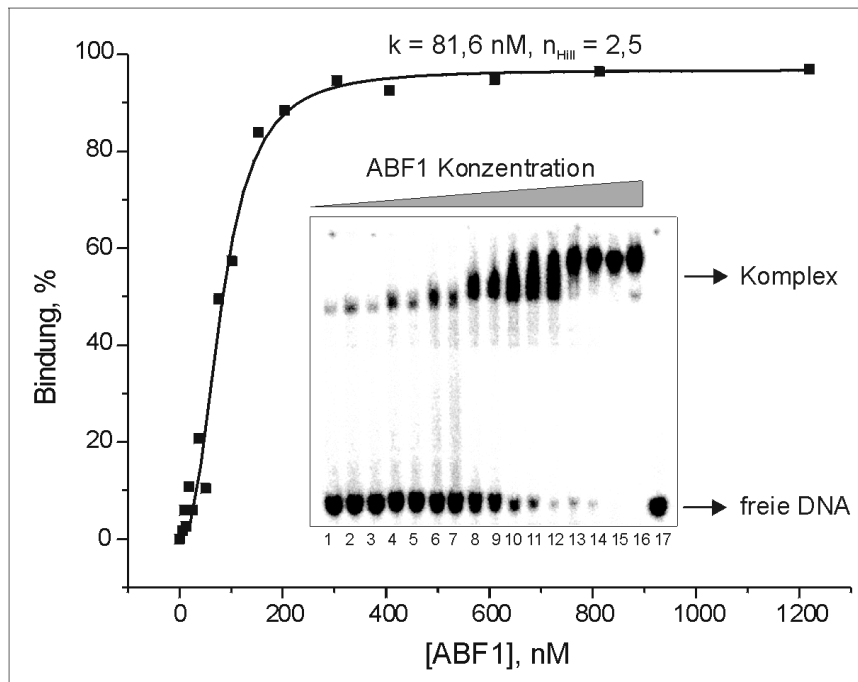


Abb. 4-18 DNA-Bindung und K_D -Bestimmung nach Autoradiographie des PAAG's. Bahn 1–16: ABF1 mit DNA; Bahn 17: DNA. Die K_D -Bestimmung erfolgte nach der Hill-Gleichung.

Um eine minimale Sequenzlänge für eine hochaffine ABF1-DNA-Bindung zu bestimmen, wurde die ABF1-Bindungssequenz aus dem ARS120-Element schrittweise bis zu 14 bp verkürzt und mittels EMSA analysiert (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3 Einfluss der DNA-Sondenlänge auf die ABF1-Wechselwirkung mit ars120-dsDNA. Das DNA-Bindungsmotiv ist fett markiert. Die K_D -Werte wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

ABF1-Erkennungssequenz aus dem ARS120-Element	DNA-Länge [bp]	K_D [nM]
5'- CCGTGCATAATGAC	14	Keine Bindung
5'- GTGT CGTGCATAATGAT	17	915 ± 123
5'- GTGT CGTGCATAATGATGTG	20	30,0 ± 10,0
5'- CAAGTGT CGTGCATAATGATGTGGGT	27	3,7 ± 0,6
5'-GCGCCAAGTGT CGTGCATAATGATGTGGGTGCGG	34	11,9 ± 1,9

Sequenzlänge von 27 bp wurde als optimal für die ABF1-Bindung ($K_D=3,7$ nM) und als ausreichend für die notwendigen ionischen Wechselwirkungen mit den funktionellen DNA-Gruppen detektiert. Mit der Verkürzung der Sequenzlänge auf 20 bp wurde eine deutliche Verminderung der Affinität beobachtet ($K_D = 30$ nM). Dieser Affinitätsverlust wird beim 17 bp langen Oligonukleotid dramatisch, denn die bestimmte apparente Gleichgewichtskonstante ist nochmals 30fach höher. Es ist nicht auszuschließen, dass die Entfernung des ABF1-Erkennungsmotivs von dem 5'-DNA-Ende, vor allem bei den kürzeren Oligonukleotiden, und die auf das Erkennungsmotiv folgenden Nukleotide eine sehr große Rolle für die Affinität der ABF1-Bindung spielen.

Einige der potentiellen ABF1-Bindungsstellen des Hefegenoms besitzen mehrere ABF1-Erkennungsmotive, die sich in verschiedenen Abständen zueinander befinden und in eini-

gen Fällen überlappt sind. Vom *ded1*-Motiv wurden beispielsweise die überlappenden Sequenzen genauer untersucht (Abb. 4-19).

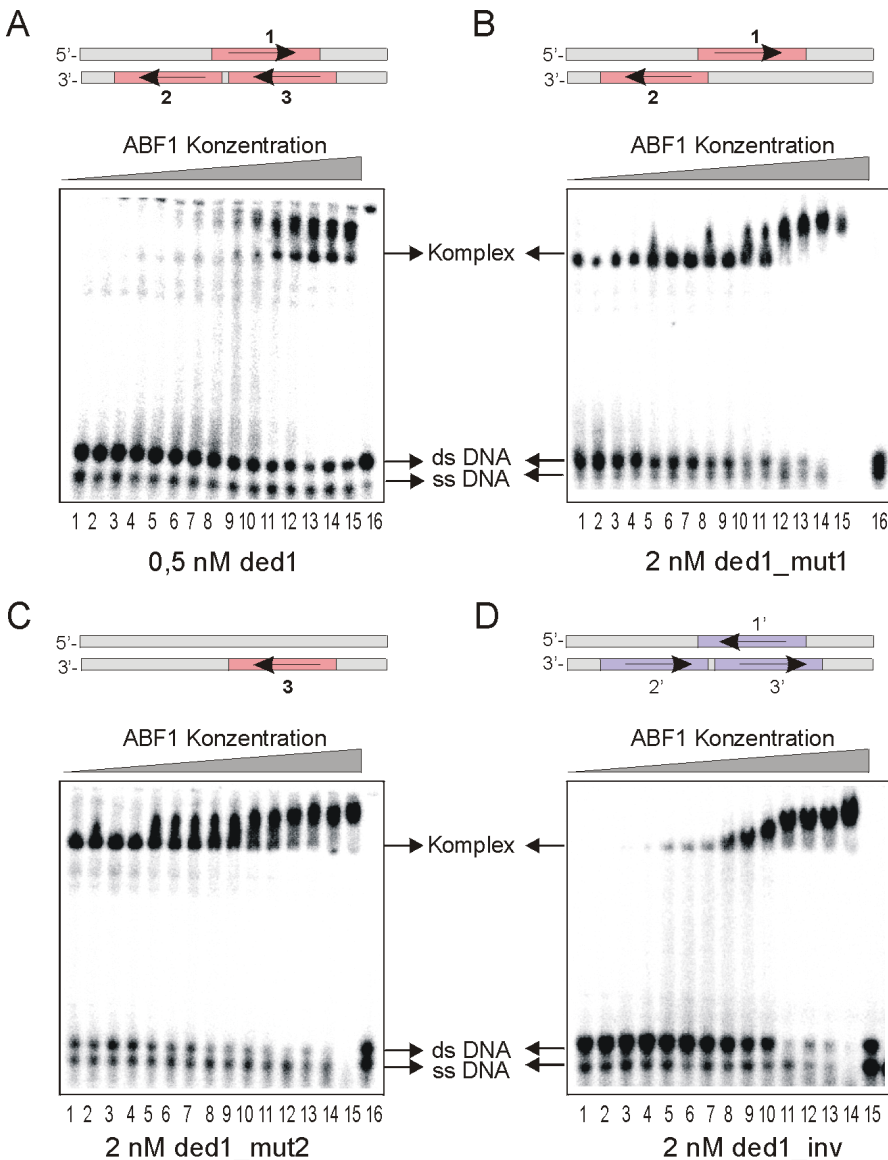


Abb. 4-19 Autoradiographie des Retardationsgels zur ABF1-Bindung an dsDNA der *ded1*-Promotorregion. Die ABF1-Konzentration steigt von Bahn 1: 0,61 nM (A), 9,35 nM (B, C), 12,7 nM (D) bis zu Bahn 14: 1220 nM (D); Bahn 15: 122 nM (A), 1220 nM (B, C). Bahn 15 (D) / 16 (A–C): freie DNA. Das Oligonukleotid *ded1* enthält drei, *ded1_mut1* – zwei, *ded1_mut2* – ein ABF1-Erkennungsmotiv; *ded1_inv* – invertierte *ded1*-Sequenz.

Die *ded1*-Genpromotorregion enthält drei ABF1-Erkennungssequenzen (1.: 5'- CGTGTCTATTCTGAA; 2.: 5'- CGTATAGAATGAT; 3.: 5'- CGTTCAGAATGAC) auf den beiden DNA-Strängen. Das führt zu der gleichzeitigen Entstehung von zwei ABF1-DNA-Komplexen, mit unterschiedlichem Wanderungsverhalten (Abb. 4-19, A). Durch die Modifizierung des Motivs 3 wird die Bindung schwächer ($K_d = 27,4$ nM) (Tabelle 4-4), und erst bei den höheren ABF1-Konzentrationen entsteht eine „Supershift“-Bande in dem PAAG (Abb. 4-19, B). Die ABF1-Bindung an das Konsensusmotiv 3 in dieser Promotorregion führt ebenfalls der Bildung einer „Supershift“-Bande und trotz hoher Sequenzhomologie zwi-

schen 2. und 3. Motiv zu einem Komplex mit höherer Affinität ($K_d = 10,5$ nM) (C). Bei dem *ded1*-Oligonukleotid wurde keine hochkooperative Bindung von Proteinaggregaten beobachtet. Die ABF1-Bindung kann auch durch eine Überlappung der Erkennungsmotive geschwächt werden, wie bei der *ypt1*-Genpromotorsequenz. Dagegen hat die Überlappung der Sequenzen im *rpo1*-Motiv wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität ($K_d = 0,3$ nM).

Der Einfluss der invertierten DNA-Sequenzen auf die K_D -Werte wurde mit mehreren Oligonukleotiden getestet. Nachdem die 5'-Sequenzrichtung auf 3' invertiert wurde, bindet das Protein an das *ded1_inv* Oligonukleotid (D) zwar schwächer ($K_d = 190,4$ nM), aber immer noch signifikant, was mit einer neu gebildeten, modifizierten Erkennungssequenz (5'-**CGTAGTAAGAT**IAT), die ein dT statt dG Nukleotid (unterstrichen) enthält, zu erklären ist. Andererseits wechselwirkt – im Vergleich mit einem wt *rpo1*-Motiv – die invertierte Sequenz aus der Promotorregion des *rpo1*-Gens fast 1000fach schwächer ($K_d = 278,2$ nM) mit ABF1. Für das invertierte ARS1-Element wurde eine K_D von ca. 2000 nM bestimmt, was mit den K_D -Werten für eine unspezifische DNA, die kein „CGT“-Erkennungsmotiv enthält, übereinstimmt (ARS1_mut Sequenz, Tabelle 4-5). Eine deutliche Erhöhung der K_D beweist einen richtungsorientierten DNA-Bindungsmechanismus des ABF1-Proteins, genauso wie es für alle anderen DNA-bindenden Proteine zutrifft.

Tabelle 4-4 Zusammenfassung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der ABF1-Wechselwirkung mit DNA-Sonden aus den Promotorregionen. Das ABF1–DNA-Erkennungsmotiv ist fett markiert; ein modifiziertes Erkennungsmotiv ist unterstrichen; mut: veränderte Sequenz; inv: invertierte Sequenz (5' = 3' inv); wt: wild Typ Sequenz.

ABF1-Bindemotiv		Analysierte DNA-Sequenz	K_D [nM]
<i>his7</i>	wt	5' - ATTAGCC GTGGAGAGAGAG AAAAATAAT	$35,0 \pm 2,6$ $n_{Hill} = 3,5 \pm 0,8$
<i>ded1</i>	wt	5' - TAATGCATCATTCTATAC CGTGTCATTCTGA ACGAGGCGCGC 3' - ATTACG TAGTAAGATATGC CACAGTAAGACTTGCCTCCGCGCG	$13,0 \pm 0,7$ $n_{Hill} = 2,4 \pm 0,2$
<i>ded1</i>	mut1	5' - TAATGCATCATTCTATAC CGTGTCATTCTGA ATAAGGCGCGC 3' - ATTACG TAGTAAGATATGC CACAGTAAGACTTATTCCGCGCG	$27,4 \pm 4,5$
<i>ded1</i>	mut2	5' - TAATGCATCATTCTATATATATGT CATTCTGA ACGAGGCGCGC 3' - ATTACG TAGTAAGATATATA CAGTAAGACTTGCCTCCGCGCG	$10,5 \pm 2,4$
<i>ded1</i>	inv	5' - CGCGCGGAGCAAGTCTTACTGTGCATATCTTACTACGTAAT 3' - GCGCGCCTCGTTCAGAA TGACACGT ATAGAATGATGCATTA	$190,5 \pm 10,8$
<i>rpo31</i>	wt	5' - ATTATCATCACTATATACGTGAATAT CGTGTTTCACG AAAT 3' - TAATAG TAGTGATATATGC ACTTATAGCACAAAGTGC'TTTA	$0,3 \pm 0,2$
<i>rpo31</i>	inv	5' - TAAAGCACTTTGTGCTATAAGTGCATATATCACTACTATTA 3' - ATTT CGTGAAACACG ATATTCACGTATATAGTGATGATAAT	$278,2 \pm 12,5$
<i>ypt1</i>	wt	5' - GCCTAGGTCACTGTACAC GTATATCGTG ACCCGCGGCCAAA 3' - CGGATCC AGTGACATGTGC CATATAGCACTGGGCCGCGGTTT	$81,6 \pm 5,1$ $n_{Hill} = 2,5 \pm 0,3$

Erstaunlicherweise werden verschiedene ARS-Elemente unterschiedlich stark von dem ABF1 *in vitro* gebunden (Tabelle 4-5). Vor allem die ARS-Elemente, die das ABF1-Erkennungsmotiv zweimal besitzen, wie ARS121 und ARS1501 (Raychaudhuri *et al.* 1997), werden an einer der Sequenzen schwächer von dem Protein gebunden. Dabei spielen die Unterschiede in der DNA-Länge zwischen den Motiven keine Rolle: ABF1-Bindestellen im ARS121 sind 30 bp, im ARS1501-Element – 400 bp von einander entfernt, d.h. beide Motive sind für die ABF1-Erkennung als unabhängig voneinander zu betrachten. Bemerkenswert ist, dass in vielen Gelretardationsexperimenten eine „Supershift“-Bande in PAAG detektierbar war und eine positive Kooperativität der ABF1-Bindung identifiziert wurde ($n_{\text{Hill}} = 1,4-3,5$).

Tabelle 4-5 Zusammenfassung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der ABF1-Wechselwirkung mit der DNA aus den ARS-Elementen. Das ABF1–DNA-Erkennungsmotiv ist fett markiert; mut: veränderte Sequenz; inv: invertierte Sequenz (5' = 3' inv); I und II: erste und zweite Erkennungssequenz im ARS-Element; wt: wild Typ Sequenz.

ABF1-Bindemotiv		Analysierte DNA-Sequenz	K_D [nM]
ARS1	wt	5' - GCAAATTT CGTCAAAAATGATA AAGAAAC	1,4 ± 0,1
ARS1	inv	3' - GCAAATTT CGTCAAAAATGATA AAGAAAC	ca. 2000,0
ARS1	mut	5' - GCAAATTCATTGAAAGGTTGTAAGAAC	1875,7
ARS120	wt	5' - CAAGTGT CGTGCATAATGAT GTGGGT	3,7 ± 0,6
ARS121	I	5' - TTT CGTATTTAGTGAT TATAATACTT	13,4 ± 2,3
ARS121	II	5' - TGATAC GTCTTTGTCA TTATATACCCAAAGGTTT	107,7 ± 10,3 $n_{\text{Hill}} = 1,4 ± 0,1$
ARS1501	I	5' - CAGAAAAT CGTACAGTGTGAT TTTTCTTTTCG	13,5 ± 4,2
ARS1501	II	5' - CATATTTAC GTATTTGCTGAT GATTGTTGG	123,4 ± 4,6 $n_{\text{Hill}} = 2,7 ± 0,2$

Aus den berechneten K_D -Werten lässt sich schließen, dass die Bindungsaffinität auch von der DNA-Sequenz zwischen den konservierten CGT- und GA-Nukleotide abhängt. Zum Beispiel, das ARS1-Element enthält sechs A:T Basenpaare in dem variablen Teil der Bindungssequenz, im Gegensatz zu dem his7-Element, das ein (GA)₃-Motiv beinhaltet und eine starre DNA-Struktur ausbildet. Die Gleichgewichtskonstanten unterscheiden sich für beide Sequenzen ca. 6fach. Es besteht die Möglichkeit, dass die sieben Nukleotide, die im ARS1-Element die beiden konservierten Motive trennen, nicht direkt an der Bindung beteiligt sind, sondern eine DNA-Biegung während der ABF1-Bindung erleichtern. Deshalb wurden folgende ARS1-Modifikationen vorgenommen: das ARS1-Element enthält sechs A:T Basenpaare im nicht-konservierten Bereich der ABF1-Erkennungssequenz. Bis zu fünf dieser A:T bp wurden gegen G:C bzw. dT gegen dC ausgetauscht. Dann wurde das Proteinbindungsverhalten an diese veränderten ABF1-Erkennungsmotive untersucht (Tabelle 4-6).

ARS1 5'- GCAAATTTCGTCAAAAATGATAAAGAAAC
4 2 1 3 5

Modifizierte Base	Basenpaarung G:C	Fehlpaarung A:C
	K_D [nM]	K_D [nM]
-	1,4 ± 0,1	
1	2,7 ± 0,8	5,1 ± 0,6
1, 2	3,6 ± 0,6	20,1 ± 5,3
1, 2, 3	2,1 ± 0,4	80*
1, 2, 3, 4	6,4 ± 0,6	107*
1, 2, 3, 4, 5	8,3 ± 0,5	150*

Tabelle 4-6 Darstellung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der ABF1-Bindung an modifizierte ARS1-Fragmente. Das wt ARS1-Fragment ist dargestellt; die Zahlen bezeichnen die modifizierte Position. * – die 50%ige Bindung, die aus dem PAAG bestimmt wurde. Das ABF1-Erkennungsmotiv ist markiert.

Diese Experimente zeigen, dass die apparente K_D , im Vergleich mit der wt Sequenz, erst in der Anwesenheit von vier bzw. fünf G:C Basenpaare ca. 5fach größer wurde. Überraschenderweise ist das ABF1-Protein, das als ein dsDNA-bindender Transkriptionsfaktor bekannt ist, in der Lage, eine 28 bp lange ARS1-DNA (5'-GCAAATTTCGTCAAAAATGATAAAGAAAC-3'), die ungepaarte Nukleotide (markiert) zwischen den konservierten CGT- und GA-Motive (unterstrichen) enthält, spezifisch zu binden. ABF1 bindet das ungepaarte Oligonukleotid bei einer Fehlpaarung zwar 3fach und bei fünf Fehlpaarungen bis zu 100fach schwächer als das native ARS1-Motiv, aber genauso stark wie z. B. die vollkomplementäre dsDNA-Sequenz ARS121-II ($K_D = 107,7 \pm 10,3$ nM) bzw. 1501-II ($K_D = 123,4 \pm 4,6$ nM). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass nur wenig Kontakte zwischen ABF1 und den untersuchten Nukleotiden ausgebildet werden.

Zusammenfassend wurde in den dargestellten Daten gezeigt: 1) Die Verkürzung der DNA-Sequenzlänge auf 20 bp bedeutet annähernd eine 10fache Verminderung der ABF1-Bindungsaffinität; 2) das ABF1 weist einen richtungsorientierten DNA-Bindungsmechanismus auf; 3) das Vorhanden von zwei ABF1-Erkennungsmotiven in einem ARS-Element bedeutet eine ca. 10fach schwächere ABF1-Bindung an einem der Motive; 4) in den variablen Bereichen der Erkennungssequenz finden nur wenige ABF1-DNA-Kontakte statt.

4.2.2.3. ABF1-Bindung an methylierte ARS1-Sequenzen

Die Methylierung der CpG-Sequenzen stellt ein Mechanismus der Modulation der Promotoraktivität sowie ein Mittel zur Langzeitrepression von Genen dar und wurde in Verbindung mit einer inaktiven Chromatinstruktur gebracht (Razin 1998; Razin & Cedar 1994). Typischer und am meisten untersuchter ist der Cys₂-His₂-Zink-Finger. Er erkennt drei Basen (oft in der C:G bp) in der DNA pro ein Zn-Finger-Motiv (Berg 1990). Falls bei der DNA-Protein-Wechselwirkung die Zink-Finger-Motive an der Bindung beteiligt sind, kann die Affinität der Bindedomäne zu DNA über eine C-Methylierung verändert werden (Isalan & Choo 2000). In der ABF1-Erkennungssequenz ist ein konserviertes CGT-Motiv vorhanden, das für die ABF1-Bindung an die DNA essenziell ist. Da das Zinkfinger-Motiv bei der ABF1-DNA-Wechselwirkung als potenzielle Kontaktdomäne in Frage kommt, wurde ein modifiziertes

ARS1-Element (Abb. 4-20) in der Bindung mit ABF1 untersucht. Diese DNA-Proben enthielten an den bezeichneten Positionen eine bzw. zwei 5-Methyl-dC-Modifikationen.

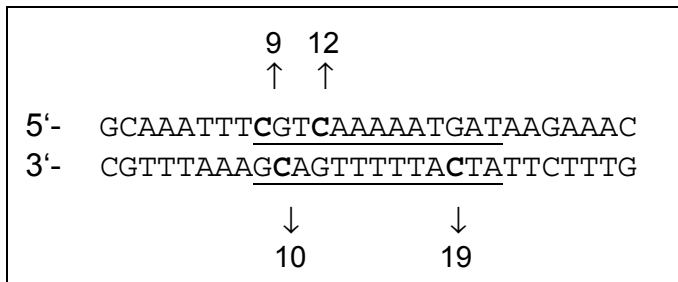


Abb. 4-20 Methylierte Nukleotide im ABF1-Erkennungsmotiv des ARS1-Elements. C = 5-Methyl-dC; die Zahlen bezeichnen die modifizierte Position; das ABF1 Erkennungs- und Bindungsmotiv ist unterstrichen.

Die Daten in der Abb. 4-21 zeigen, dass die 5-Methyl-dC-Modifikation an der 10. und 12. Position die Bindung zwischen ABF1 und Oligonukleotid im Vergleich mit dem wt ARS1-Element verstärkt. Die Methylierung an der Position 9 und 19 schwächt dagegen die ABF1-DNA-Wechselwirkung 5- bis 10fach. Besonders bei der Doppelmodifikation (9–19) ist der Einfluss der DNA-Methylierung stark ausgeprägt. Ein höherer K_D -Wert bei den anderen Sequenzen mit zwei 5-Methyl-dC (9–10 und 12–19) im Vergleich mit der hemimethylierten DNA könnte durch eine stärkere Veränderung der DNA-Struktur verursacht sein. Aus den durchgeführten Experimenten geht hervor, dass die Nukleotide an der Position 9 und 19 von besonderer Bedeutung für die Bildung der Kontaktpunkte zwischen ABF1 und dem ARS1-Element sind.

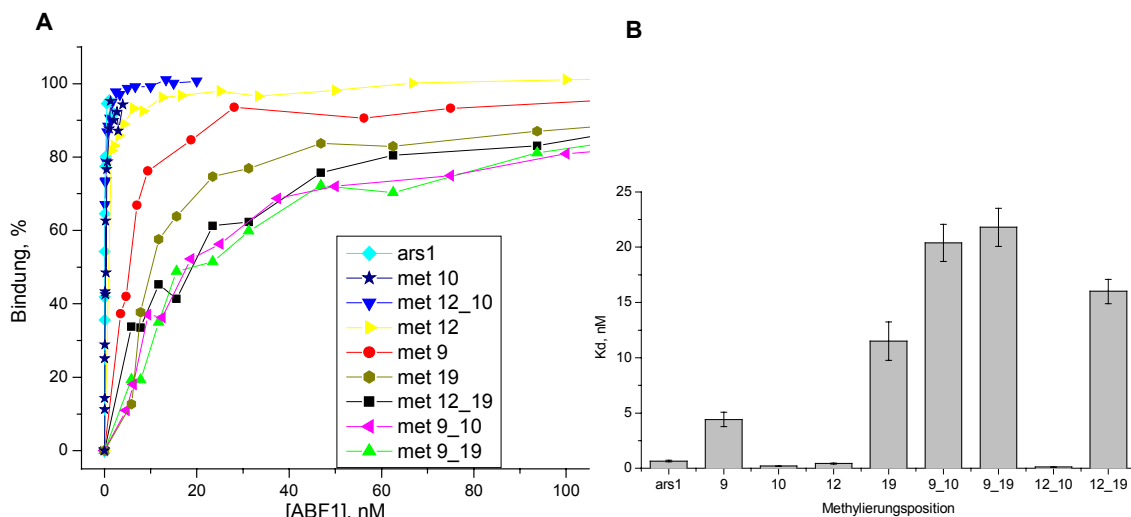


Abb. 4-21 K_D -Bestimmung der ABF1-Bindung mit modifizierten ARS1-Elementen. (A) Vergleich der ABF1-DNA-Bindungskurven, (B) Einfluss der DNA-Methylierung auf die apparente K_D . Unmodifiziertes ARS1-Fragment diente als positive Kontrolle. K_D : Dissoziationskonstante.

4.2.3. Bestimmung des ABF1-Oligomerisierungszustands in der Anwesenheit von DNA

Nach den durchgeführten ABF1-DNA-Wechselwirkungsexperimenten konnte es nicht ausgeschlossen sein, dass das Entstehen des zweiten langsam wandernden Proteinkomplexes von der Proteinkonzentration in der Lösung abhängig ist und nicht direkt etwas mit der Protein-DNA-Multimerisierung zutun hat (Abb. 4-5). Um diese Frage zu klären, wurde eine HPLC-Analyse von ABF1 und ABF1-DNA-Komplexen auf einer Gelfiltrationssäule durchgeführt (3.5.4). Um eine hohe Proteinkonzentration in der auf die Säule aufgetragenen Probe zu erreichen, wurde das ABF1-Protein auf einer SP-Sepharose-Spinsäule konzentriert (3.5.3). 8500, 3400 und 744 pmol ABF1's in den 100 µl des Laufpuffers wurden auf die Gelfiltrationssäule TSG G3000SW aufgetragen (Abb. 4-22).

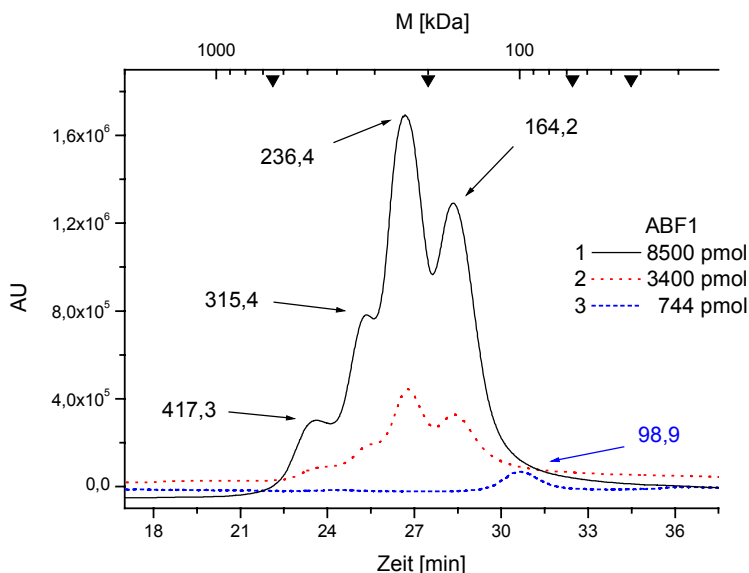


Abb. 4-22 HPLC-Profil der ABF1-Multimeren. Die Trennung wurde in der TSG G3000SW 600x7,5 mm Gelfiltrationssäule (Bio-Rad, München) durchgeführt. Proteindetektion: 210 nm; die Zahlen weisen auf das berechnete Molekulargewicht hin. ▼ – Massenstandard gf7. Die aufgetragene ABF1-Menge ist in der Legende aufgelistet. Die aus der Proteinsequenz berechnete ABF1-Masse beträgt ca. 82 kDa.

Das HPLC-Profil zeigt deutlich ABF1-Multimere, die im SDS-Gel (Abb. 4-3) nicht zu sehen sind. In der 1. und 2. Probe sind überwiegend ABF1-Dimere und Trimere vorhanden. Tetra- bzw. Pentamere kommen nur in kleinen Mengen vor. In der 7,4 µM (744 pmol) Proteinprobe wurden dagegen nur Monomere identifiziert.

Zur Überprüfung des ABF1-Oligomerisierungszustands in Anwesenheit von DNA, wurde ein Gemisch aus ABF1 und DNA auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (Abb. 4-23). Aufgrund der nicht-globulären DNA-Form ist die Beweglichkeit der DNA-Moleküle in der Gelfiltrationssäule im Vergleich zu globulären Proteinen, die für die Bildung der Massenstandardkurve verwendet wurden, verlangsamt. Aus diesem Grund ist die genaue Massenbestimmung der ABF1-DNA-Komplexen bzw. der DNA mit diesem Verfahren nicht möglich. Das Experiment zeigt aber die Verschiebung des Proteinsignals (Kurve 3) nach der Inkubation mit dsDNA (Kurve 2) sehr deutlich. Bei der ABF1-Bindung an spezifische DNA entsteht ein

hochmolekularer Komplex, der einer Proteinmasse von 232,5 kDa entspricht und der wahrscheinlich aus zwei ABF1- und 1–2 dsDNA-Molekülen besteht (Kurve 1).

Die gezeigten Daten bestätigen die Vermutung, dass die ABF1-Oligomerisierung von der Proteinkonzentration abhängig ist und die Bildung von hochmolekularen ABF1-DNA-Multimeren unterstützt.

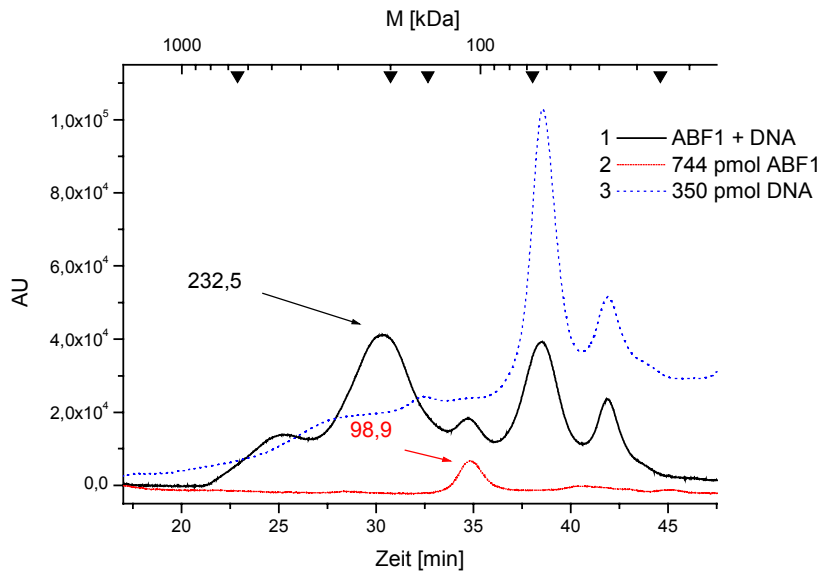


Abb. 4-23 HPLC-Profil der DNA und ABF1-Multimeren. ABF1 wurde mit 28 bp langer dsDNA x115p/abf-Ts in 100 μ l Laufpuffer 10 min inkubiert und auf die TSG G3000SW 600x7,5 mm Gelfiltrationssäule (Bio-Rad, München) aufgetragen. Die Proteinsignaldetektion erfolgte bei 210 nm (dargestellt), 260 und 280 nm, DNA-Bestimmung – bei 210nm (dargestellt) und 260 nm; die Zahlen verweisen auf das berechnete Molekulargewicht. ▼ – Massenstandard gf5. Theoretisch berechnete ABF1-Masse beträgt ca. 82 kDa, dsDNA-Masse – 17,3 kDa.

4.2.4. SPR-Analyse der ABF1-DNA-Reaktionskinetik

Ein wichtiger Bestandteil der Protein-DNA-Wechselwirkungsanalyse ist die Bestimmung der Proteinaffinität zur DNA. Für die Charakterisierung von Protein-DNA-Gleichgewichtskonstanten wurden aufgrund der einfachen Durchführbarkeit vor allem Filterbindungs- und EMSA-Experimente eingesetzt. Diese Ansätze haben jedoch den Nachteil, dass es sich nicht um echte Gleichgewichtsmessungen handelt und dass nur apparente K_D -Werte bestimmt werden können. Außerdem ist die Messung der Reaktionskinetik mittels diesen Methoden nicht zugänglich. Die in den letzten Jahren eingeführte Methode der SPR (Oberflächenplasmonenresonanz) erlaubt dagegen eine Charakterisierung der Reaktionskinetik sowie die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante. Das Ziel der nachstehend beschriebenen Experimente war es, die Bindungskinetik des ABF1-DNA-Komplexes mittels SPR zu messen und die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten zu bestimmen. Dazu wurde eine biotinylierte 27 bp lange DNA aus dem ARS121-I-, ARS120- oder ARS1-

Element auf einen SA-Chip immobilisiert. Für eine Messreihe wurden 7–10 Bindungskurven bei ABF1-Konzentrationen zwischen 0,2 und 20 nM aufgenommen.

Für die Charakterisierung der Reaktionskinetik wird oft eine linearisierte Darstellung der Bindungskurven verwendet (Seimiya & Kurosawa 1996; Suh *et al.* 1999). Für die Assoziationsphase gilt

$$\frac{dRU}{dt} = k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max} - (k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot RU \quad \text{Gl. 8-2}$$

Dabei ist RU_{\max} die maximal mögliche Bedeckung, RU ist die bedeckte Chipoberfläche, $[A_0]$ ist die Konzentration des zugegebenen Analyten. Theoretisch ist die dRU/dt vs. RU Grafik linear mit einer Steigung $-s = k_A \cdot [A]_0 + k_D$. Zur Ermittlung von k_A -Werten trägt man zunächst dRU/dt gegen RU auf (Abb. 4-24, A). Aus der Steigung der linearen Grafik ($-s$) gegen ABF1-Konzentration erhält man die k_A - und aus dem Achsenabschnitt k_D -Werte. Wenn $k_A \cdot C \gg k_D$, ist der berechnete k_D -Wert nicht mehr als zuverlässig zu betrachten (BIAtechnology Handbook, 1994).

Die Dissoziationsphase kann mit einer Reaktionskinetik 0. Ordnung folgendermaßen beschrieben werden

$$\ln \frac{RU_0}{RU_t} = k_D \cdot (t - t_0) \quad \text{Gl. 8-8}$$

Aus dem $\ln(RU_0/RU)$ vs. $(t - t_0)$ Grafik (Abb. 4-24, C) lassen sich die k_D -Werte ableiten. Diese Darstellung der Bindungskurven zeigt, dass die Assoziationsphase bei allen untersuchten Bindungsreaktionen nur aus einem Prozess besteht, und legte dagegen die Existenz mindestens zweier Dissoziationsreaktionen nahe. Während ersten 200 s dominiert die Dissoziationskinetik des ersten schnelleren Prozesses, ab etwa 400 s trägt ausschließlich die langsame Dissoziationsreaktion zum Signal bei. Diese lineare Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten ist mit einer gewissen Ungenauigkeit verbunden (O'Shannessy *et al.* 1993) und wurde daher nur für die Feststellung der Anzahl an Reaktionsprozessen verwendet.

Für die weitere Charakterisierung der Bindungskinetik wurden die Sensogramme, wie durch O'Shannessy empfohlen (O'Shannessy *et al.* 1993), getrennt für die Assoziations- und Dissoziationsphase mit der *BIAevaluation*-Software ausgewertet (Abb. 4-25).

Die Dissoziationskurven ließen sich nicht durch einen 1:1 Modell zu beschreiben und zeigten mindestens zwei exponentiell verlaufende Prozesse, weshalb die Auswertung der Reaktionskinetik nach dem Modell „Zwei Dissoziationsreaktionen“ durchgeführt wurde (Abb. 4-25, A):

$$RU_t = RU_{01} \cdot e^{-k_{D1} \cdot (t-t_0)} + RU_{02} \cdot e^{-k_{D2} \cdot (t-t_0)} \quad \text{Gl. 8-10}$$

Für die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante wurde die Assoziationsreaktion nach dem „Langmuir 1:1“-Bindungsmodell:

$$RU(t) = \frac{k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max}}{k_A \cdot [A]_0 + k_D} \cdot (1 - e^{-(k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot t}) \quad \text{Gl. 8-3}$$

ausgewertet, in dem jeweils die k_{D1} oder k_{D2} als Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (Abb. 4-25, B) eingesetzt wurde.

ABF1-Bindung an ARS1 (300 mM NaCl, 16°C, 10 µl/min)

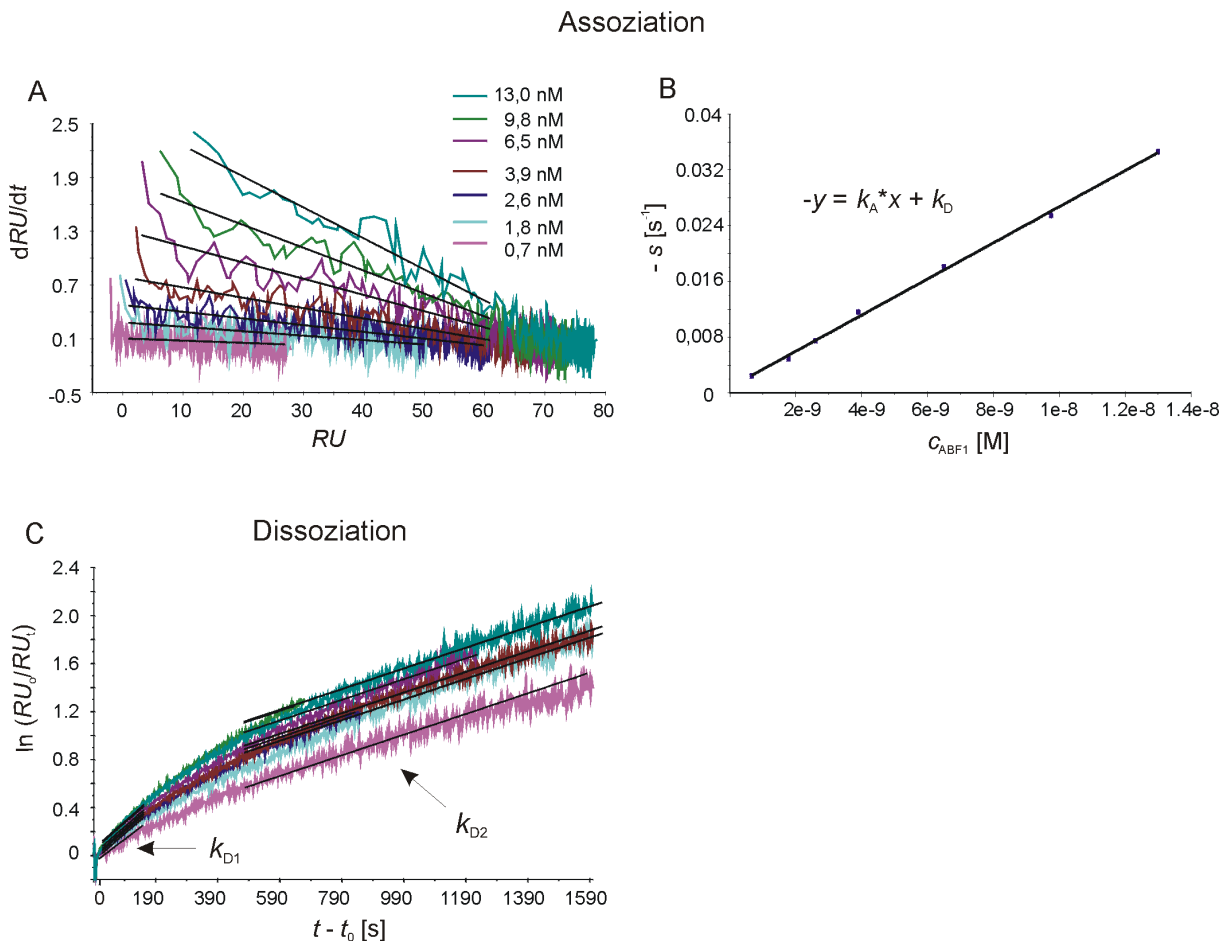


Abb. 4-24 Linearisierte und logarithmische Berechnung von k_A - und k_D -Werte der ABF1-ARS1-Bindungsreaktion. Die Berechnung der Assoziationskonstante k_A erfolgte aus der Steigung $-s$ der „ dRU/dt vs. RU “ Grafik, wie in (B) dargestellt ist; die Berechnung der Dissoziationskonstanten k_{D1} und k_{D2} (C) erfolgte aus der $\ln(RU_t/RU_{t_0})$ vs. $(t - t_0)$ Grafik. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen sind in (A) dargestellt. RU – Resonanzsignal im Sensogramm.

Nach dieser Auswertung wurden auch zwei K_D -Werte für den Bindungsprozess erhalten. Dabei hat die schnellere Dissoziation einen Anteil von maximal 10–20 % der Gesamtreaktion im Temperaturbereich von 10 °C bis 35 °C und ist zum Teil von der Proteinkonzentration abhängig. Aus diesem Grund wurde nur der zweite, langsamere Prozess als essentiell betrachtet und die berechnete K_{D2} für eine Bestimmung der thermodynamischen Bindungsparameter berücksichtigt (Tabelle 4-8).

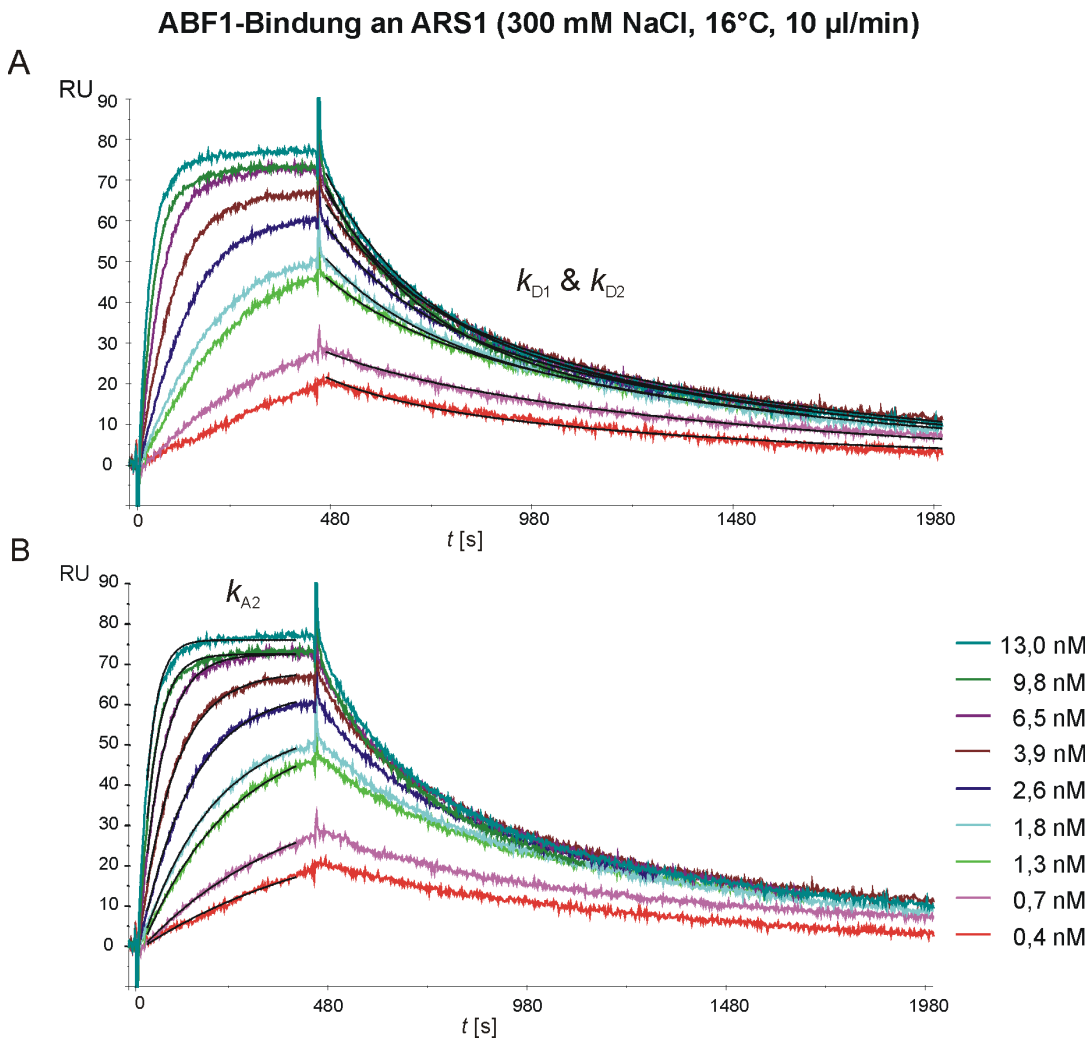


Abb. 4-25 Auswertung der Sensogramme nach dem „Zwei Dissoziationsreaktionen“ (A) und „1:1 Langmuir Assoziation“ (B) Modell. Für die Berechnung der Assoziationskonstante k_{A2} wurde der k_{D2} -Wert für alle Proteinkonzentrationen als konstant eingesetzt.

Als Erklärung für die zwei exponentiellen Dissoziationsreaktionen kommt ein Rebindungsprozess in Frage. Dieser kann durch eine höhere Flussgeschwindigkeit eliminiert werden (Stockley *et al.* 1998; Suh *et al.* 1998). Bei einer sehr schnellen Bindungsreaktion zwischen Analyt und spezifischer Oberfläche entsteht ein Konzentrationsgradient des freien Analyten in der Lösung. In diesem Fall spielt der Massentransporteffekt eine wesentliche Rolle für die Beschreibung der Assoziationsprozesse. Die beiden unerwünschten Ereignisse – Diffusionskontrolle und Rebindung an die Oberfläche – wurden durch die ausgewählten Bedingungen (Flussrate von 10 µl/min, 200 mM NaCl-Konzentration bzw. Temperatur von 16°C) eliminiert. Die Geschwindigkeitskonstanten einiger Messreihen wurden zum Vergleich zwar nach dem Massentransportmodell berechnet, unterscheiden sich aber nicht wesentlich von den Konstanten k_A und K_D , die nach dem „Langmuir 1:1“ Modell errechnet wurden (Tabelle 4-7). Deshalb wurden für die weitere Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten die Modelle „1:1 Langmuir Assoziation“ und „Zwei Dissoziationsreaktionen“ angewendet (Anhang 8.3).

Tabelle 4-7 Vergleich der nach verschiedenen Modellen berechneten Reaktionsparameter für die ABF1-ARS1-Bindung. k_D : Dissoziationsgeschwindigkeits-, k_A : Assoziationsgeschwindigkeits-, K_D : Gleichgewichtskonstante. Bindungsbedingungen: 300 mM NaCl, 16°C, Flussrate von 10 μ l/min (Abb. 4-24, Abb. 4-25).

Kurvenabschnitt	Modell	k_D [$\cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$]	k_A [$\cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	K_D [$\cdot 10^{-9} \text{ M}$]
Assoziation	-S vs. C_{ABF1}	8,15	2,59	0,315
Dissoziation	$\ln R_0/R_n$ vs. t	21,4 8,67		
Dissoziation	k_{D1} & k_{D2}	48,1 8,79		
Assoziation	1:1 Langmuir (mit k_{D2})	(8,79)	2,63	0,334
Assoziation + Dissoziation	1:1 Bindung mit Massentransfer	30,8	5,19	0,593

Durch die Erhöhung der Salzkonzentration oder der Temperatur wird die Dissoziationsreaktion stark beschleunigt, im Gegensatz zur kaum beeinflussten Assoziation. In der Abb. 4-26 sind die Sensogramme der Bindungsreaktion zwischen 3,9 nM ABF1 und einem 28 bp langen ARS1-Fragment bei konstanter Temperatur (A) bzw. NaCl-Konzentration (B) verglichen.

Wie aus dem Diagramm A hervorgeht, ist das Bindungsgleichgewicht zwischen ABF1 und der DNA stark salzabhängig. Ab 500 mM NaCl war kaum eine Bindung zu beobachten (Abb. 4-26, A). Die K_{D2} -Werte nehmen von 0,0006 nM (100 mM NaCl) bis 1,78 nM (500 mM NaCl) zu. Im dargestellten Beispiel ist nur die Dissoziationskonstante k_D sehr stark von der Salzkonzentration beeinflusst. Im NaCl-Konzentrationsbereich von 100 bis 350 mM wird nur eine sehr geringe Änderung der Geschwindigkeitskonstanten k_A (1,3fach) feststellbar. k_D steigt dagegen von $1,61 \cdot 10^{-6} / \text{s}$ auf $1,8 \cdot 10^{-4} / \text{s}$. Wie für die meisten spezifischen DNA-Bindungsreaktionen, ist die $\log k_A$ bzw. $\log k_D$ vs. $\log c_{\text{NaCl}}$ Grafik linear mit einer Steigung (SK_A bzw. SK_D) zu beschreiben (Record *et al.* 1991) (Abb. 4-27).

Nach Record *et al.* gilt für die Berechnung der ausgetauschten Kationen während der Protein-dsDNA-Bindung gilt, $\Delta n_{\text{Kation}} = SK_A / 0,88$. Dabei wurde $SK_A = -5,7 \pm 0,28$ für die ABF1-ARS1-Bindung bestimmt. Dementsprechend wären 6–7 ionische Kontakte an der Protein-DNA-Wechselwirkung beteiligt. Bei der hochaffinen ($K_D = 0,34 \text{ pM}$) Tus-TerB-Bindung (Tus = *E. coli* Replikation Terminator Protein) wurden z. B. 13 Kationen ausgetauscht (Neylon *et al.* 2000).

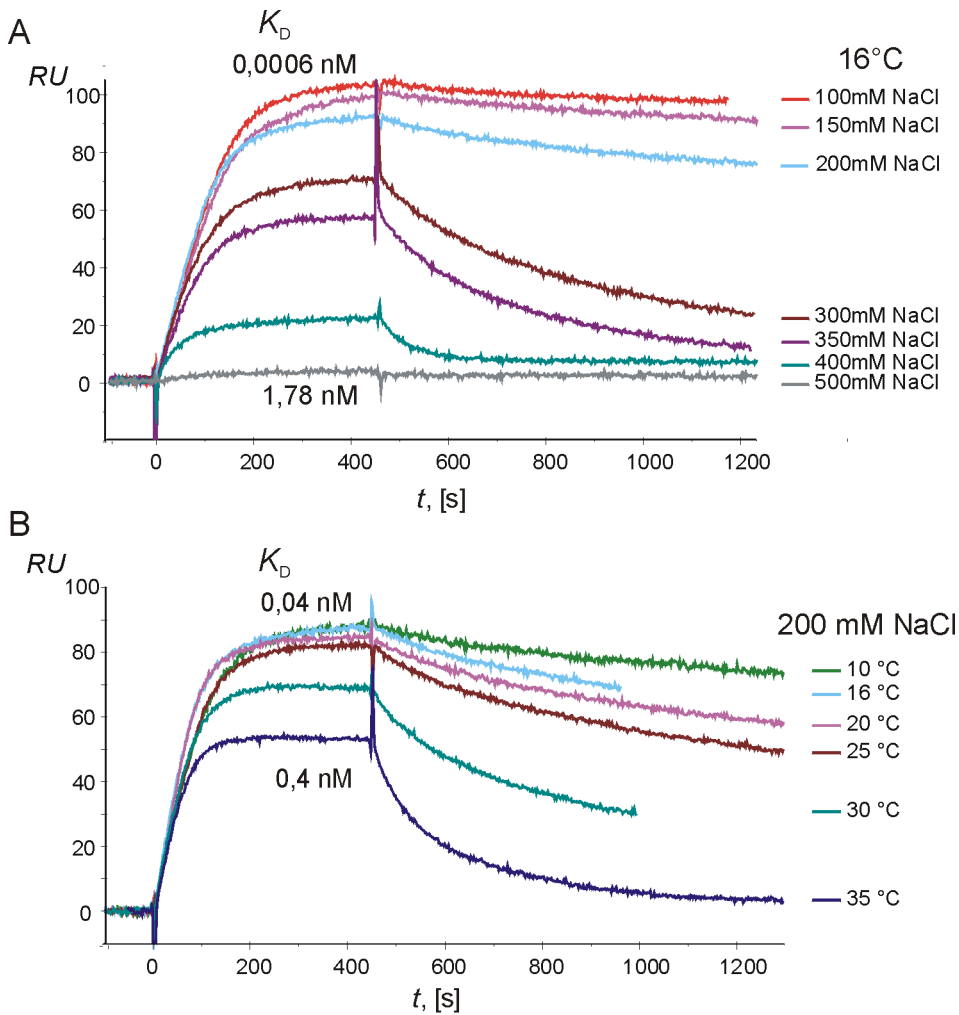


Abb. 4-26 Sensogramme der Bindungsreaktion von 3,9 nM ABF1 an ein 28 bp langes ARS1-Fragment bei steigender Salzkonzentration (A) und Temperatur (B). Die DNA wurde über Biotin auf einem SA-Chip immobilisiert; die Flussrate betrug 10 μ l/min; (A) Die Sensogramme wurden bei 16°C, (B) – im Biacore-Laufpuffer mit 200 mM NaCl aufgenommen. Die berechneten K_{D2} -Werte sind neben der entsprechenden Kurve angegeben.

Eine Temperaturerhöhung von 10 °C auf 30 °C bzw. 35 °C ist mit einer deutlichen Veränderung der Protein-DNA-Wechselwirkung verbunden (Abb. 4-26, B). Dabei wurde nicht nur weniger Protein an der Oberfläche gebunden, sondern ABF1 dissoziiert, im Vergleich zur ABF1-DNA-Reaktion zwischen 10 und 25°C, auch viel schneller ab. Die berechneten Reaktionskonstanten sind in der Abb. 4-28 und Tabelle 8-2 wiedergegeben. Wie bei der Änderung der Salzkonzentration, bleibt die Assoziationsgeschwindigkeit auch von einer Temperaturerhöhung nahezu unberührt.

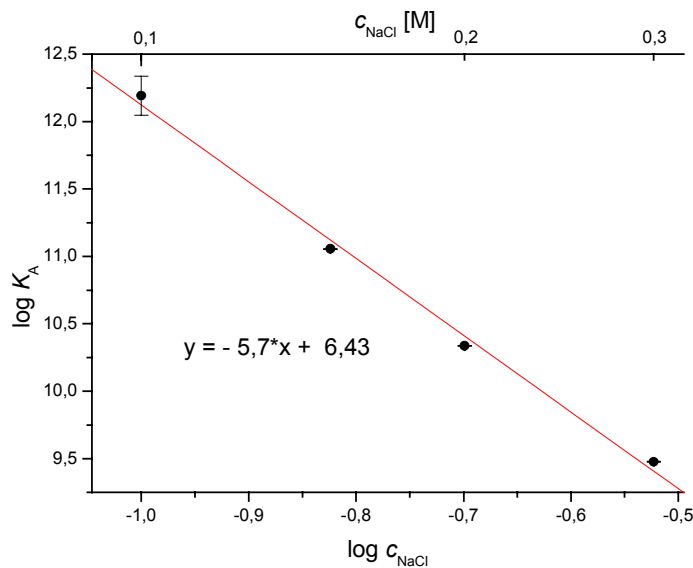


Abb. 4-27 Lineare Auswertung der $\log K_A$ vs. $\log c_{\text{NaCl}}$ Grafik. Die Standardabweichung wurde nach Gl. 8-14 berechnet.

Genauso wie bei der Änderung der Ionenstärke, wurde die Bindungsreaktion zwischen ABF1 und ARS1-Fragment wiederum mit einem Assoziationsprozess und zwei Dissoziationsreaktionen modelliert. Die Werte der Konstanten k_{D1} und k_{D2} unterscheiden sich mindestens um den Faktor 10. Für den ersten Dissoziationsprozess war kein Zusammenhang zwischen T und k_{D1} feststellbar.

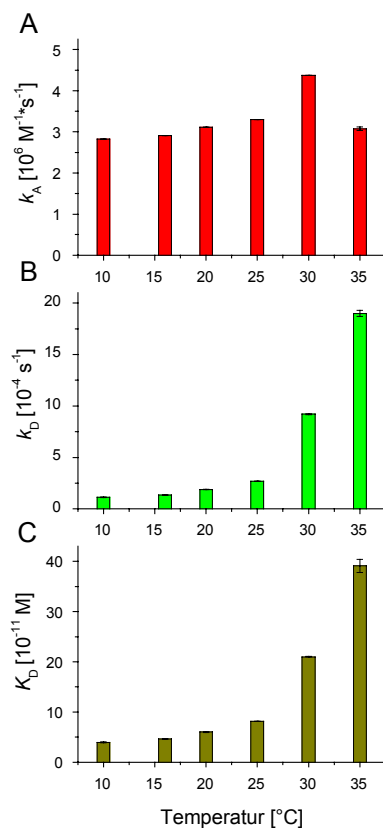


Abb. 4-28 Einfluss der Temperatur auf die Reaktionskonstanten der ABF1-Bindung mit immobilisierter DNA. Die aus 7–10 Sensogrammen errechneten Assoziations- (k_A), Dissoziations- (k_D) und Gleichgewichtskonstanten (K_D) sind mit Fehlerbalken angegeben.

Zwischen 15 °C und 25 °C bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit fast unverändert. Die langsame Reaktion, die wieder einer spezifischen ABF1-DNA-Dissoziation zugeordnet wurde, wurde dagegen mit der Temperaturerhöhung deutlich beschleunigt.

Aus den für verschiedene Temperaturen berechneten K_D -Werten wurde die Änderung der freien Gibbs-Energie (ΔG) nach der Gl. 4-2 berechnet.

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad \text{Gl. 4-2}$$

Hierbei ist R die Gaskonstante ($8,31447 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) und T die absolute Temperatur. Die Änderung der Enthalpie (ΔH) und Entropie (ΔS) wurde aus der van't Hoff Gleichung berechnet:

$$\ln K_D = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Gl. 4-3}$$

Die Auftragung $\ln K_D$ vs. $1/T$ nennt man dabei van't Hoff-Plot. Wenn ΔH und ΔS temperaturunabhängig sind, ergibt sich aus dem van't Hoff-Plot eine Gerade. In dargestelltem Fall weicht der van't Hoff-Plot für die ABF1-ARS1-Bindung deutlich von der Linearität ab (Abb. 4-29), was bedeutet, dass die Temperaturunabhängigkeit nicht erfüllt ist.

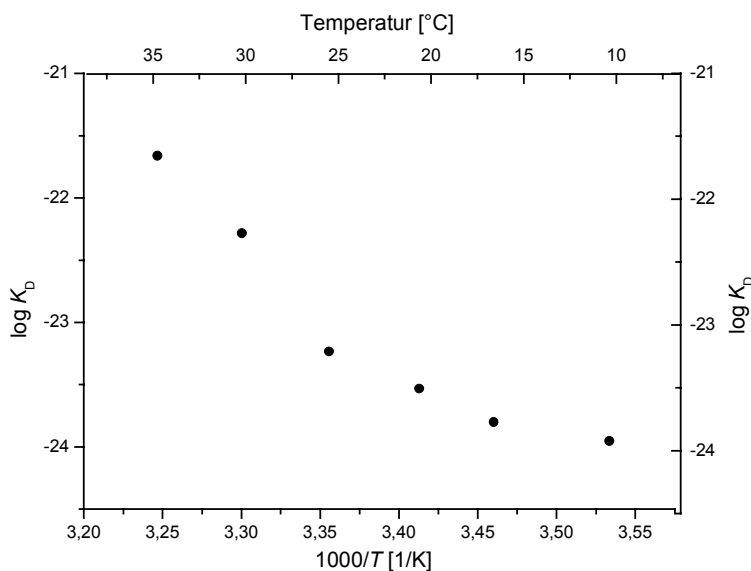


Abb. 4-29 van't Hoff-Plot der ABF1-ARS1-Bindung.

Für eine spezifische Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Wechselwirkung weichen die ΔH - und ΔS -Werte entsprechend einer Änderung der Wärmekapazität ΔC_p von einer Linearität ab und sind temperaturabhängig (Spolar & Record 1994). Nach dem Kirchhoffschen Satz

(Wedler 1997) $\Delta H_2 = \Delta H_1 + \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT$ und unter der Annahme, dass die Änderung der Wärmekapazität im ausgewählten Temperaturbereich konstant bleibt, gilt

$$\Delta H_2 = \Delta H_1 + \Delta C_p \cdot (T_2 - T_1) \quad \text{Gl. 4-4}$$

Aus dem Gl. 4-3, mit Berücksichtigung von ΔC_p , gilt für die K_D -Abhängigkeit von der Temperatur (Myszka 2000):

$$K = K^0 \cdot e^{-\frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^0} \right)} \cdot e^{\frac{\Delta C_p \cdot T}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^0} \right)} \cdot \left(\frac{T}{T^0} \right)^{\frac{\Delta C_p}{R}} \quad \text{Gl. 4-5}$$

Die gemessenen K_A -Werte für die ABF1-ARS1-Bindungsreaktion wurden gegen T aufgetragen (Abb. 4-30) und nach der van't Hoff Gleichung (Gl. 4-5) mit und ohne ΔC_p ausgewertet. Ohne Berücksichtigung der Wärmekapazität weicht die theoretische Kurve (.....) deutlich von den Messpunkten ab. Aus dem dargestellten *Fit* der Daten (—) wurden ΔH - und ΔC_p -Werte erhalten. ΔG wurde nach der Gl. 4-2 mit den aus dem *Fit* gewonnenen K_A -Werten errechnet. ΔS lässt sich aus der Gleichung $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ ermitteln. Die berechneten energetischen Parameter der Reaktion zwischen ABF1 und DNA sind in der Tabelle 4-8 zusammengefasst.

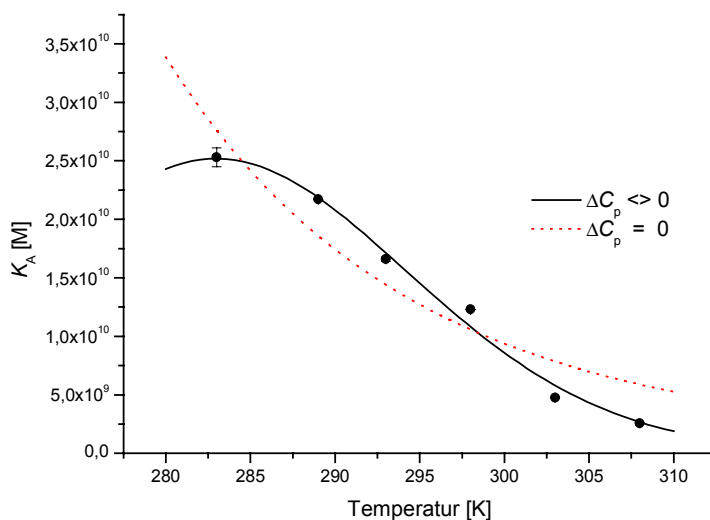


Abb. 4-30 Auswertung der K_A vs. T Grafik der ABF1-ARS1-Bindung. Für die Berechnung der thermodynamischen Parameter wurde eine Änderung der Wärmekapazität ΔC_p (—) berücksichtigt (Gl. 4-5) oder gleich Null gesetzt (.....). T : Temperatur in Kelvin.

Tabelle 4-8 Thermodynamische Parameter der ABF1-Bindung mit dem 27 bp langem ARS1-Element. Die Bindungsreaktion wurde in einem Puffer HBS-EP mit 200 mM NaCl durchgeführt. Die Standardabweichung für ΔG und ΔS wurde nach der Gl. 8-16 und Gl. 8-17 berechnet.

t [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔG [kJ/mol]	ΔS [kJ/mol·K]	ΔC_p [kJ/mol·K]
25	$-80,24 \pm 9,20$	$-57,56 \pm 0,00001$	$0,47 \pm 0,03$	$-5,34 \pm 1,09$
25	$-44,81 \pm 9,25$	$-57,56 \pm 0,00001$	$0,52 \pm 0,03$	0

Zum Vergleich wurden die thermodynamischen Parameter der oben gezeigten Kurven mit und ohne ΔC_p ausgewertet. Wenn $\Delta C_p = 0$ geht die Gl. 4-5 in die Gl. 4-3 über, und die so berechnete $\Delta H_{25^\circ\text{C}}$ ist gleich $-44,81$ kJ/mol im Vergleich mit $-80,24$ kJ/mol bei der Berücksichtigung der Wärmekapazitätsänderung. Die experimentellen Daten zeigen, dass die Wärmekapazität der Moleküle eine deutliche Rolle bei der spezifischen ABF1-DNA-Bindung spielt. Im gegebenen Fall beträgt ΔC_p $-5,34 \pm 1,09$ kJ/mol·K. Die Wärmekapazität beschreibt die Entfernung der nicht-polaren (np) und polaren (p) Gruppen von der Solvent-zugänglichen Oberfläche (SAS) während der site-spezifischen Bindung:

$$\Delta C^0 = (0,32 \pm 0,04)\Delta A_{np} - (0,14 \pm 0,04)\Delta A_p \quad [\text{cal/mol}\cdot\text{K}] \quad \text{Gl. 4-6}$$

Hier wird ΔA in \AA^2 gemessen. Für die Faltung der globulären Proteine gilt $\frac{\Delta A_p}{\Delta A_{np}} = 0,59$

(Mazur *et al.* 2000; Spolar & Record 1994). Unter der Annahme, dass das ABF1-Protein eine globuläre Struktur bildet, wie es auch aus den AFM-Messungen (Atomic Force Microscopy) folgt (unveröffentlicht, M. Lysetska, Bayreuth), wurde für die DNA-ABF1-Bindung $\Delta A_{np} = -5370 \text{\AA}^2$ und $\Delta A_p = -3168 \text{\AA}^2$ berechnet. Die Ergebnisse entsprechen dem von Ren dargestellten Zusammenhang zwischen ΔC_p und ΔA_{np} für die Proteinentfaltungs- und Bindungsreaktionen (Ren *et al.* 2000). Die Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter von der Temperatur ist für die ABF1-ARS1-Bindungsreaktion in der Abb. 4-31 dargestellt.

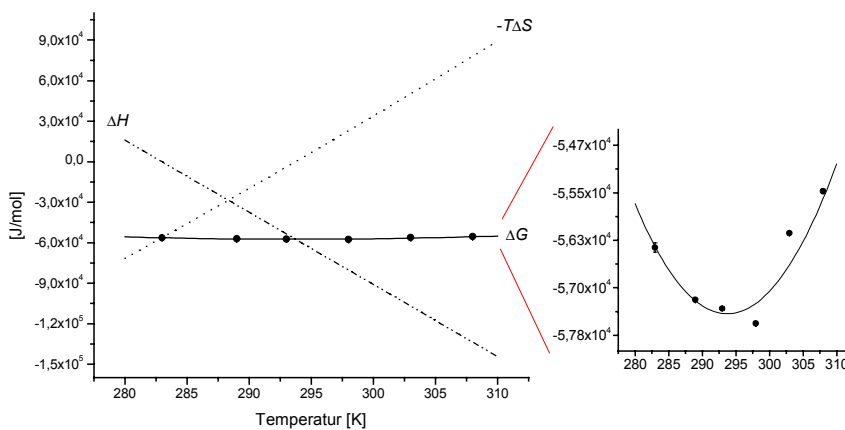


Abb. 4-31 Änderung der thermodynamischen Parameter bei der ABF1-ARS1-Bindung. Die Punkte entsprechen dem aus den experimentellen K_D -Werten abgeleiteten ΔG . Funktion von ΔH , ΔG und ΔS wurde aus der van't Hoff'schen Gleichung unter Berücksichtigung von ΔC_p berechnet.

Bei den niedrigen Temperaturen wird die ABF1-DNA-Bindungsreaktion über die Reaktionsentropie reguliert, bei den höheren – über die Enthalpie.

In der SPR-Messung wurden nicht nur verschiedene Reaktionsbedingungen für die ABF1-Bindung mit ARS1 getestet, sondern auch die ABF1-Wechselwirkung mit drei verschiedenen ARS-Elementen (ARS1, ARS120, ARS121-I) verglichen (Abb. 4-32).

Die ABF1-ARS120- bzw. -ARS121-1-Dissoziationsreaktion wurde ebenfalls mit zwei Geschwindigkeitskonstanten, die sich ca. 5fach voneinander unterscheiden, beschrieben. Für die Berechnung der K_D und k_A -Werte wurde nur die k_{D2} – wie für das oben analysierte ARS1-Fragment – berücksichtigt. Die k_D -Werte aller drei untersuchten ARS-Fragmente sind fast identisch. k_A der ARS121-I-Sequenz unterscheidet sich etwa 2,5fach von den ARS1- und ARS120-Konstanten. Die Assoziationsreaktion ist offensichtlich DNA-Sequenz abhängig und bestimmt die Unterschiede der K_D -Werte in der ABF1-Bindung an die verschiedenen DNA-Fragmente.

Mittels der SPR-Messung wurde die ABF1-ARS1-Bindungsreaktion kinetisch und thermodynamisch charakterisiert. Die Reaktion zwischen ABF1 und dem ARS1-Fragment verläuft in einer Assoziations- und zwei Dissoziationsphasen. Die erste schnellere Phase entsteht entweder durch eine unspezifische bzw. nicht-exakte ABF1-Bindung an die DNA oder ist

durch das Messsystem bedingt und wird erst bei den nanomolaren Gleichgewichtskonstanten deutlich. Aus diesem Grund wurde nur die zweite Dissoziationsphase als eine für den ABF1-ARS1-Komplex spezifische betrachtet. Da die diffusionskontrollierte Bindungsreaktion bzw. Rebindung des Analyten in der Dissoziationsphase ausgeschlossen wurde, konnten die gemessenen Sensogramme mit den kinetischen Modellen „1:1 Langmuir Assoziation“ (Gl. 8-3) und „Zwei Dissoziationsreaktionen“ (Gl. 8-10) beschrieben werden. Die Dissoziation des ABF1-Proteins von der DNA ist offensichtlich eine salzkonzentrations- und temperaturkontrollierte Reaktion. Die Assoziationsgeschwindigkeit ist dagegen nur von der Zusammensetzung der Nukleotide im Erkennungsmotiv anhängig. Die spezifische ABF1-DNA-Wechselwirkung ist mit einer Änderung der Wärmekapazität von $-5,34 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$ verbunden.

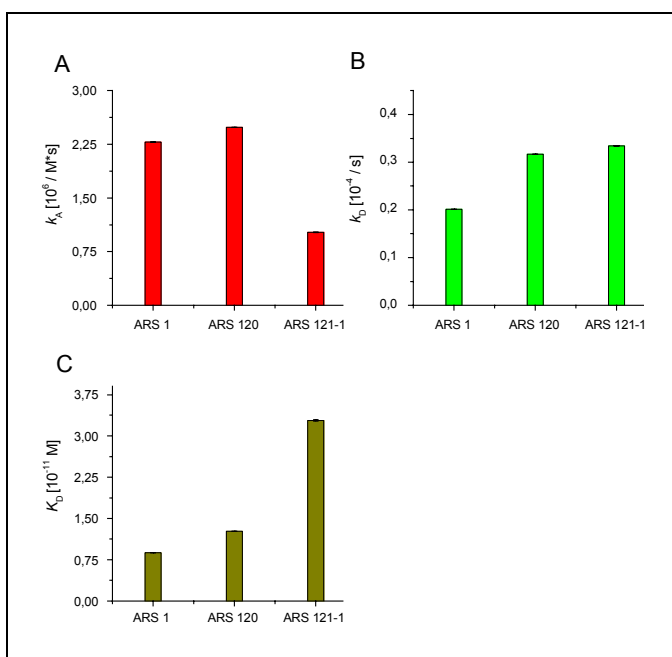


Abb. 4-32 Vergleich der ABF1-DNA-Bindungskonstanten. Die aus 7–10 Sensogrammen berechnete Assoziations- (A), Dissoziations- (B) und Gleichgewichtskonstanten (C) sind dargestellt. ARS-Sequenzen sind in 2.3 aufgelistet.

4.3. Photoquervernetzungsexperimente zur Bestimmung der ABF1-DNA-Kontaktpunkte

UV-Bestrahlung führt zur Bildung von kovalenten Protein-DNA-Komplexen und erlaubt eine Aussage über Kontaktpunkte zwischen Protein und DNA (Allen *et al.* 1991) (Sekiguchi & Shuman 1996). Eine solche kovalente Verknüpfung der Protein-DNA-Komplexe wird mit Hilfe von photoreaktiven Nukleotiden, die ortsspezifisch in die DNA eingebaut sind, ausgeführt. Nach der Bestrahlung der Komplexe mit UV-Licht kommt es zur Verknüpfung des photoreaktiven Nukleotides mit reaktiven Aminosäuren des Proteins. Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war, ein Verfahren zu etablieren, um die kontaktierende Aminosäure in dem ABF1-DNA-Komplex zu identifizieren. Dafür musste ein kovalenter ABF1-DNA-Komplex gebildet, gereinigt und sequenziert werden.

Für eine ortsspezifische Photoquervernetzung wurden mit 5-Iod-2'-desoxyuridin substituierte ABF1-spezifischen Oligonukleotide verwendet und UV-Lampen (254 nm und 312 nm) oder UV-Laser (HeCd-Laser (325 nm), XeCl-Excimer-Laser (308 nm)) eingesetzt. Die Optimierung der Quervernetzungsbedingungen in bezug auf Pufferzusammensetzung und DNA- bzw. Proteinkonzentration erfolgte in einer Mikrotiterplatte unter Bestrahlung mit einer UV-Lampe. Für die präparative Gewinnung des kovalenten DNA-ABF1-Komplexes wurden die Proben mit HeCd-Laser bestrahlt.

4.3.1. Optimierung der Quervernetzungsbedingungen

4.3.1.1. Vergleich der Oligonukleotide in Quervernetzungsexperimenten mit ABF1

Der Vergleich der drei verschiedenen Oligonukleotide aus den ARS1- und ARS120-Elementen sowie der *his7*-Promotorregion zeigte (Abb. 4-33), dass die Quervernetzungsausbeute nicht nur von der IdU-Position auf der DNA (Probe *his7_a* und *his7_b*), sondern auch von der Gleichgewichtskonstante (K_D) abhängig ist. Denn eine stärkere ABF1-Bindung an die DNA führte zu höheren Ausbeuten des Photoquervernetzungsproduktes.

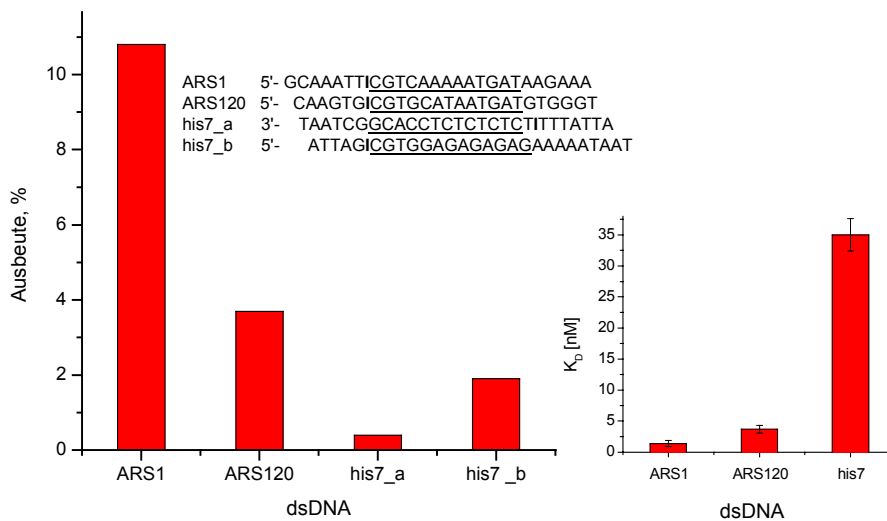


Abb. 4-33 Einfluss der DNA-Sequenz auf die Bildung der DNA-ABF1-Quervernetzungsprodukte. 50 nM des Oligonukleotids wurden mit 500 nM ABF1 in einem H05-Puffer (pH 7,5) 1,5 h mit einer Germizidlampe (254 nm) bestrahlt. Das ABF1-Bindungsmotiv ist unterstrichen; I: IdU-Nukleotid; *his7_a* Oligonukleotid ist komplementär zu *his7_b*; in der Abbildung sind nur modifizierte dsDNA-Stränge dargestellt.

4.3.1.2. Optimierung der Bedingungen für die Quervernetzungsreaktion zwischen ABF1 und ARS1-Element

Die höchste Quervernetzungsausbeute (bis zu 20 %) wurde für den ABF1-ARS1-Komplex bei der Bestrahlung mit der Germizidlampe erzielt. Die Verwendung des XeCl-Lasers brachte nicht nur keine bessere Ausbeute an quervernetztem ABF1-DNA-Komplex, sondern führte unter verwendeten Bedingungen zur Entstehung von zahlreichen Nebenprodukten, die die geplante Sequenzierung des Quervernetzungsprodukts höchstwahrscheinlich negativ beeinflusst hätte. Die Bildung von maximaler Menge des kovalenten ABF1-ARS1-Komplexes war mit dem HeCd-Laser nur bei der Laserleistung höher als 20 mW möglich. Eine Bestrahlung der Proben mit einer Laserleistung von 40 mW verkürzte die Bestrahlungszeit auf 3,5–4 h, im Vergleich mit der 8stündigen Bestrahlung bei 25 mW, führte aber zur größeren Quervernetzungsausbeuten nicht.

In früheren Arbeiten wurde die ABF1-Bindung an ARS1 unter Anwendung des HeCd-Lasers untersucht (N. Dank, 1997). Aus diesem Grund wurde ein 27 bp langes Oligonukleotid, das aus dem ARS1-Element abgeleitet wurde, für die Vorbereitung präparativer Mengen an Quervernetzungsprodukt zwecks Identifizierung der kontaktierenden Aminosäure eingesetzt. Aus den von N. Dank durchgeführten Experimenten geht hervor, dass die IdU-Substitution an Position 8 in dem Oligonukleotid xl15 (maximale QP-Ausbeute 7 %) als potenziell für die ortsspezifische Bindung mit dem ABF1-Protein zu betrachten ist (N. Dank, 1997). Die Position 21 führt ebenfalls zu einer spezifischen Quervernetzung des Proteins (Abb. 4-34). Die Modifizierung der beiden Positionen erhöht die Produktausbeute (5,5 %) und deutet auf zwei verschiedene Bindungsstellen im ABF1-Protein hin. Alternativ ist denkbar, dass die DNA nicht strikt in der Bindungstasche des Proteins fixiert ist und die gleiche Aminosäure in beiden Fällen mit der DNA quervernetzt wird.

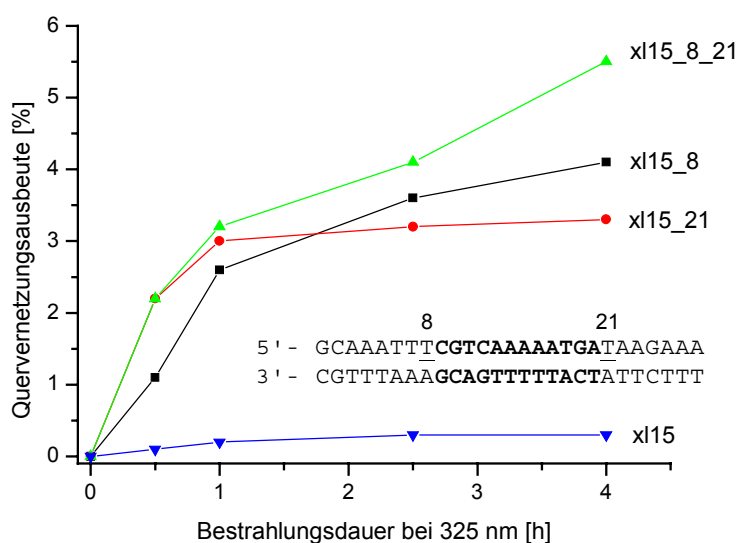


Abb. 4-34 Einfluss der iodierten Position im ARS1-Element auf die ABF1-DNA-Photoquervernetzungs- ausbeute. 50 nM des an 8. und 21. Position mit IdU modifizierten (unterstrichen) ARS1-Fragmenten wurden mit 625 nM Protein in H01-Puffer (pH 7,5) bis zu 4 h mit HeCd-Laser (325 nm, Leistung 25 mW) bestrahlt. xl15: nicht mit IdU-modifiziertes 27 bp langes Oligonukleotid. Die ABF1-Erkennungs-sequenz ist markiert.

Die Änderung der Bindungsbedingungen (H005- bzw. M005-Puffer und maximal 10facher Überschuss an ABF1) erhöhte die xl15_8-ABF1-Quervernetzung bis zu 9 % (Bestrahlung mit HeCd-Laser). Nach der Bestrahlung mit 254 nm wurden bis zur 20 % der xl15_8-DNA gegenüber 15 % bei der xl15_21-DNA quervernetzt. Es ist denkbar, dass eine stärkere Anregung der DNA bzw. der aromatischen Aminosäuren die kovalente Verknüpfung zwischen der DNA und dem ABF1 begünstigt und beschleunigt. Für die analytische ABF1-DNA-Produktpräparation wurde die Bestrahlung mit der Germizidlampe (254 nm) wegen der höheren Quervernetzungsausbeuten und kürzere Bestrahlungsdauer bevorzugt verwendet.

4.3.2. *Bestimmung der DNA-Bindungsdomäne des ABF1's*

Zur Identifizierung der kovalenten Kontaktpunkte zwischen DNA und ABF1 auf Aminosäureebene, war geplant, den quervernetzten Komplex proteolytisch zu verdauen und das mit einem Oligonukleotid verknüpfte Peptid zu isolieren und zu sequenzieren. Dafür war es notwendig, die Reinigungs- und Spaltungsbedingungen für den Protein-DNA- bzw. Peptid-DNA-Komplex zu optimieren. Diese Vorexperimente wurden mit analytischen Mengen an ABF und an der Position 8 substituiertem Oligonukleotid xl15_8 durchgeführt.

4.3.2.1. *Reinigung und Konzentrierung des Protein-DNA-Komplexes*

Die Photoquervernetzungsausbeute liegt für die xl15_8 DNA bei ca. 5–9 % (Bestrahlung mit 325 nm) bzw. 15–20 % (254 nm). Deshalb musste zuerst die freie DNA abgetrennt werden, um die Peptid-DNA-Komplexe im PAAG aufgrund ihrer radioaktiven DNA-Markierung identifizieren zu können. Die Schwierigkeiten bestanden daran, dass sich die nicht-kovalent gebundene DNA, unter nativen Bedingungen, auch in einem Komplex mit ABF1 befindet. Vor allem, wenn das ABF1-Protein mit mindestens 10fachem Überschuss im Photoquervernetzungsansatz vorliegen muss, um eine maximal hohe Reaktionsausbeute zu erzielen. Wenn außerdem die ABF1-DNA-Gleichgewichtskonstante im nanomolaren Bereich liegt, wie es mittels EMSA bestimmt wurde, ist es denkbar, dass der kovalente ABF1-DNA-Komplex nur unter denaturierenden Bedingungen bzw. bei hoher Salzkonzentration zu trennen ist. Die Zusammenfassung der durchgeführten Experimente, um ein quervernetztes Peptid-DNA-Addukt für die MALDI-MS-Untersuchung zu erhalten, ist in Abb. 4-35 dargestellt.

Da es sich bei dem ABF1 um ein negativ geladenes Protein handelt, dessen pI-Wert gleich 4,88 ist, war es nicht möglich, effizient das Protein, die DNA und den ABF1-DNA-Komplex mittels DEAE-Spinsäulen – und trotz Verwendung von $\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ oder NaCl als Elutionspuffer – von einander zu trennen und so den reinen Komplex zu isolieren. Trotz des besseren Trennungspotenzials mit HPLC, war es ebenfalls nicht möglich mit einer Ionenaustauschsäule miniQ PE 4,6/50 (Pharmacia Biotech, Freiburg) einen genügend reinen Protein-DNA-Komplex zu gewinnen.

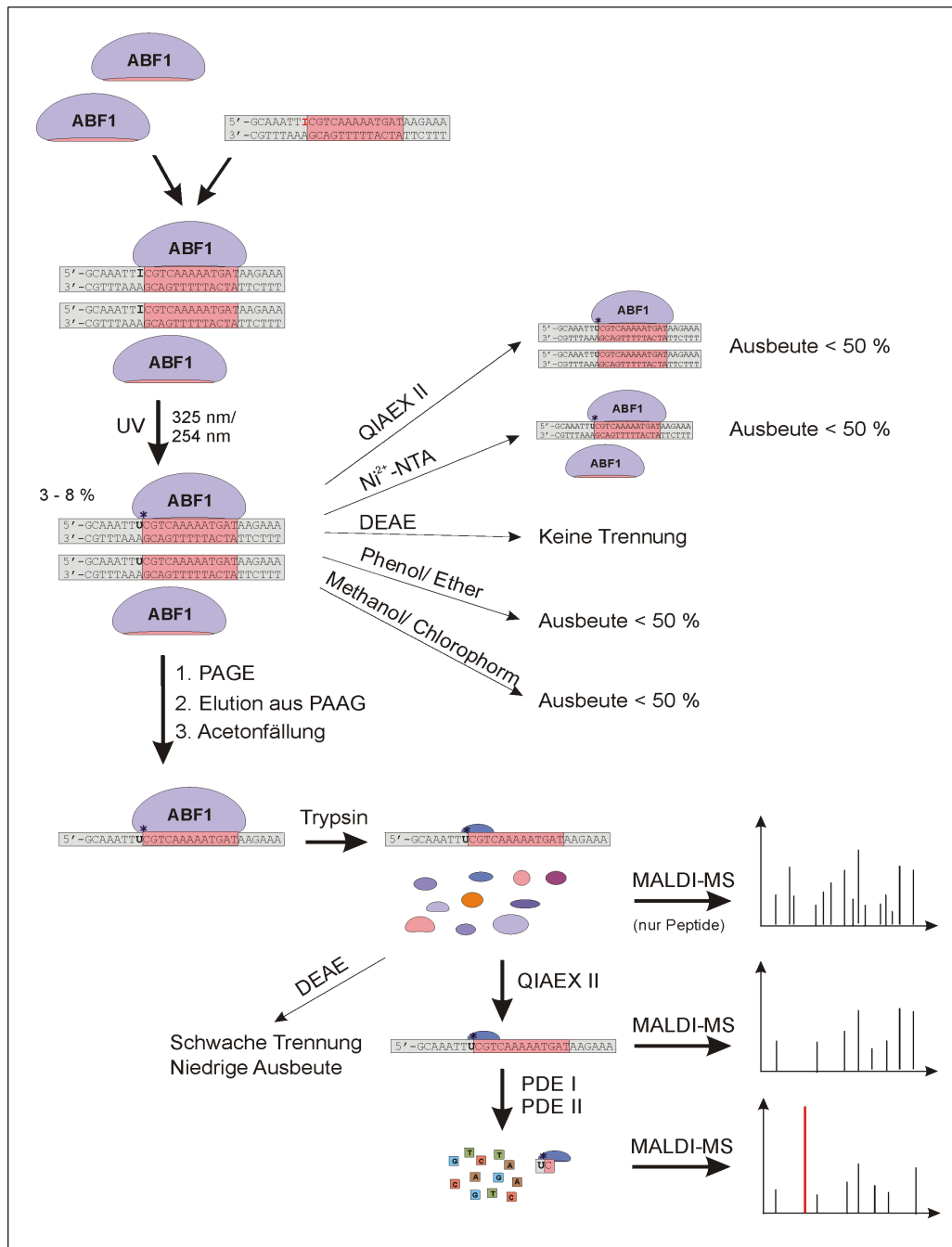


Abb. 4-35 Zusammenfassung der durchgeführten Experimente für die Bestimmung der mit DNA kontaktierenden Aminosäuren des ABF1's.

Mittels Ni²⁺-NTA-Spinsäulen gelang es dann, trotz hoher Reinigungsverluste (bis zu 50 %), die ungebundene DNA zum größten Teil abzutrennen, so dass weitere Analysen in kleinem Maßstab durchgeführt werden konnten. Für die präparative Reinigung erwies sich aber auch dieses Verfahren als nicht optimal. Die Produktverluste waren nicht akzeptabel und die Aufreinigung des DNA-ABF1-Adduktes gelang nur unvollständig. Auch die Konzentrierung des DNA-ABF1-Komplexes mittels Phenol/Ethanol- oder Methanol/Chloroformfällung war mit niedrigen Ausbeuten (< 50 %) verbunden. Die präparative Reinigung des Komplexes erfolgte schließlich nach der PAGE durch die Elution aus dem Gel, der sich eine Acetonpräzipitation anschloss. Nach dem das Präzipitat in TE bzw. H/O Puffer aufgenommen

und mit Trypsin behandelt wurde, erfolgte die Reinigung des entstandenen Peptid-DNA-Addukts mit *QIAEX II* (QIAGEN, Hilden), die sich als effektiv erwies.

4.3.2.2. *Chemische Spaltung des ABF1-DNA-Quervernetzungsproduktes*

Das ABF1-Protein enthält zwei potenzielle DNA-Bindungsregionen ein Zink-Finger (49–71 AS) und ein Helix-Turn-Helix-Motiv (323–496 AS). Um die DNA-Bindungsstelle zu lokalisieren, wurde zunächst versucht, den ABF1-DNA-Komplex chemisch in große Fragmente zu spalten. Als schonend und relativ selektiv spaltende chemische Reagenzien wurden NTCB (drei Spaltungsstellen) und Hydroxylamin (vier Spaltungsstellen) getestet (3.7.4.3, 3.7.4.4) (Abb. 4-36).

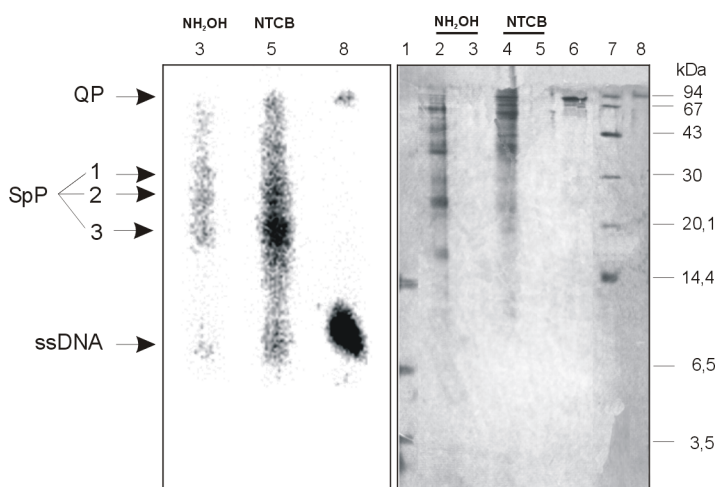


Abb. 4-36 Autoradiographie und Silberfärbung der Peptid-DNA-Komplexe nach der chemischen Proteinspaltung und Auftrennung im 16,5% SDS-Gel. Das ABF1-Protein (Bahn 2, 4, 6) und mit Ni²⁺-NTA-Spinsäulen gereinigter ABF1-DNA-Komplex (Bahn 3, 5) wurde in die Spaltung mit NTCB (Bahn 4, 5) und Hydroxylamin (Bahn 2, 3) eingesetzt. Bahn 1, 7: Längensstandard; Bahn 8: ungereinigtes Quervernetzungsprodukt (QP); SpP: Spaltungsprodukte.

Die Spaltung mit NTCB, das nur im Zink-Finger-Motiv spaltet, ist sehr informativ, falls die DNA in dem Helix-Turn-Helix-Motiv gebunden wird. In diesem Fall hätte nur ein hochmolekulares radioaktives Produkt entstehen können, wie es in Tabelle 4-9 dargestellt ist.

Tabelle 4-9 Molekulargewicht der theoretisch möglichen und identifizierten Peptid- und Peptid-DNA-Fragmente nach der chemischen Spaltung. Die ssDNA-Masse beträgt 8444 Da; die Peptid-DNA-Masse wurde experimentell in einem 16,5% SDS-Gel bestimmt; die theoretisch berechnete Masse des Komplexes wurde für die potenziellen DNA-Bindungsregionen angegeben.

Spaltungsreagenz	Spaltungsfragmente [AS]	Peptidmasse [kDa]	Peptid-ssDNA Masse [kDa]	Identifizierte Masse [kDa]
NTCB	1–48	5,6	-	ca. 20
	49–65	2,0	10,5	
	66–70	0,6	9,1	
	71–731	73,5	81,9	
Hydroxylamin	1–122	13,8	22,2	ca. 20–30
	123–165	4,8	-	
	166–501	37,2	45,6	
	502–596	10,5	-	
	597–731	15,5	-	

Die ersten Experimente zeigten, dass unabhängig vom Spaltungsreagenz mehrere radioaktive Spaltprodukte im Größenbereich von ca. 20–30 kDa entstehen. Die Entstehung von drei radioaktiven Produkten nach der Hydroxylaminspaltung ist mit einem unvollständigen Verdau (1–165 AS) bzw. einer Entstehung von Nebenprodukten in der Quervernetzungsreaktion zu erklären. Nach der Inkubation mit NTCB konnte hauptsächlich ein ca. 20 kDa großer Peptid-DNA-Komplex, der nach nicht-vollständiger Spaltung (1–65 AS) entsteht, identifiziert werden. Der Vergleich dieses Ergebnisses mit den Daten in Tabelle 4-9 deutet auf eine DNA-Bindung im Bereich des Zink-Finger-Motivs.

Die erhaltenen Spaltprodukte waren zwar für die Peptid-DNA-Sequenzierung zu groß, gaben jedoch einen ersten Hinweis für eine Beteiligung des Zink-Finger-Motivs an der DNA-Bindung.

4.3.2.3. *Tryptischer Verdau des ABF1-DNA-Komplexes*

In einem ersten Ansatz zur Identifizierung der Kontaktstellen wurde ABF1 zunächst limitierend mit Trypsin verdaut. Der Verdauansatz wurde anschließend mit der IdU-haltigen, ^{32}P -markierten DNA xl15_8 inkubiert, für 1,5 h mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt und im SDS-Gel analysiert. Abb. 4-37 zeigt, dass nur ein neues Reaktionsprodukt mit einer Masse von ca. 36 kDa aus der radioaktiv markierten DNA entsteht. Deshalb kann nur eine ca. 27 kDa große Proteindomäne an der direkten Wechselwirkung mit DNA beteiligt sein.

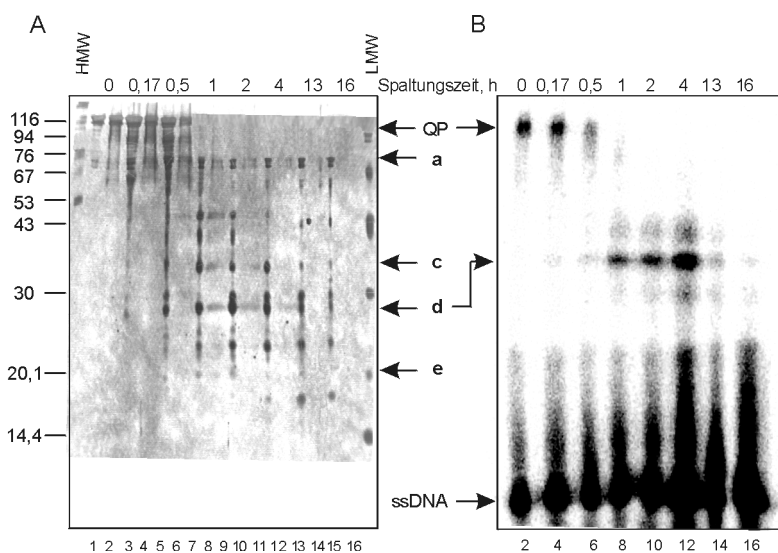


Abb. 4-37 Silberfärbung (A) und Autoradiographie (B) der im 12,6% SDS-PAAG aufgetrennten kovalenten ABF1-DNA-Komplexe nach limitierendem Trypsinverdau und Bestrahlung mit UV-Licht. Die Reaktionszeiten in Gegenwart eines 1000fachen Unterschusses an Trypsin gegenüber ABF1 sind in Stunden angegeben. 0,8 µg unbestrahlter ABF1-Probe (Bahn 1, 3, 5...) wurden neben 1,6 µg der bestrahlten Protein-DNA-Ansätze aufgetragen (Bahn 2, 4, 6...). QP: Quervernetzungsprodukt; ssDNA: 27 Basen enthaltendes Oligonukleotid xl15_8 ($M_r = 8444$); a–e: sequenzierte Peptide; d: die Masse des ca. 27 kDa Peptides entspricht ca. 36 kDa nach der Bindung mit DNA. HMW, LMW: Gewichtsstandard.

Die nach 1 h im limitierenden Verdau gebildeten Domänen a–e (Abb. 4-37) wurden nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE und nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran sequenziert. Eine Peptidmassenanalyse und die Zuordnung der sequenzierten N-terminalen Aminosäuren ermöglichte es, die während der Trypsinspaltung entstandenen stabilen ABF1-Fragmente zu bestimmen (Abb. 4-38) und eine Kontaktierung der 27 bp DNA mit der Zn-Finger-Domäne (d) zu belegen. Diese Domäne bleibt auch nach einer vierstündigen limitierenden Behandlung mit Trypsin DNA-bindungsaktiv.

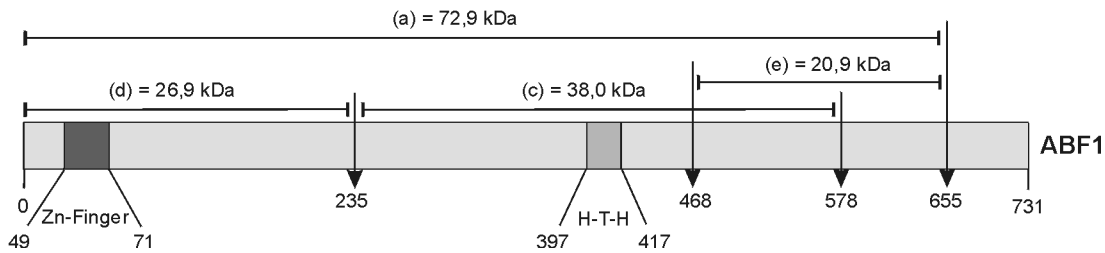


Abb. 4-38 Trypsin-Spaltstellen im ABF1-Protein. Die Pfeile geben die Trypsinspaltungsstellen an; die Zahlen zwischen den Pfeilen entsprechen der Größe (kDa) der sequenzierten Peptide. Die Zn-Finger- (Position 49–71) und Helix-Turn-Helix- (Position 397–417) DNA-Bindemotive sind markiert.

Im Weiteren wurden die Bedingungen für einen totalen Verdau des ABF1-DNA-Komplexes optimiert und mögliche Reinigungsverfahren zur Gewinnung der Peptid-DNA-Addukte getestet. Die Verwendung von CR-Säulen mit immobilisierten Proteasen (Endoproteinase Glu-C oder TPCK-Trypsin) würde protease-freie Spaltfragmente liefern. Aufgrund des unzureichenden Verdau im analytischen Maßstab konnte diese Methode für die Spaltung des Quervernetzungsprodukts im präparativen Ansatz nicht verwendet werden. Deshalb wurde das DNA-ABF1-Quervernetzungsprodukt mit einem Überschuss an freiem Trypsin zu einem Peptid-DNA-Produkt abgebaut, das in einem SDS-Gel bei etwa 14,5 kDa wandert und in einem denaturierenden PAAG ca. 35 Basen entspricht (Abb. 4-39).

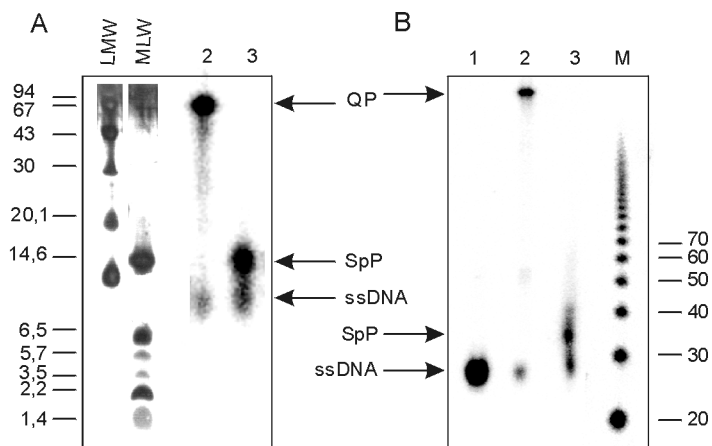


Abb. 4-39 Visualisierung der tryptischen Fragmente des Quervernetzungsproduktes nach der PAGE. (A) Auftrennung der Proben in einem 16,5% SDS-Gel nach Schagger-Jagow, LMW und MLW Standards wurden mittels Silberfärbung, die radioaktiven DNA-Fragmente wurden im InstantImager detektiert; (B) Auftrennung der Produkten in einem 12% denaturierenden PAAG. Bahn 1: 27 Basen langes Oligonukleotid x15; Bahn 2: mit Ni^{2+} -NTA-Spinsäulen gereinigtes QP; Bahn 3: Tryptischer Verdau des QP's. M: 10 Basen DNA-Leiter; SpP: Spaltungsprodukt; QP: Quervernetzungsprodukt.

Eine in analytischem Maßstab durchgeführte vollständige Chymotrypsinspaltung des ABF1-DNA-Komplexes lieferte keine kürzeren Peptidfragmente. Deshalb wurde der angereicherte präparative Quervernetzungsansatz mit einem Trypsinüberschuss behandelt. Anschließende Reinigung und Konzentrierung des Peptid-DNA-Produktes mittels *QIAEX II* sollte die Abtrennung von freien Peptiden ermöglichen und ein salzfreies Addukt liefern, das für die Peptidsequenzierung geeignet wäre.

4.3.3. Identifizierung der ABF1-Kontaktpunkte im kovalenten ABF1-ARS1-Komplex mittels MALDI-MS

Theoretisch sollte es möglich sein, das bei dem tryptischen Verdau erhaltene Nukleopeptid direkt zu sequenzieren. In der Praxis ist dies wegen des DNA-Anteils nur schwer durchzu-

führen. Nur größere Mengen des Komplexes, die völlig nebenprodukt- und salzfrei sein müssen, sind eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Deshalb wurde versucht, den quervernetzten Peptid-DNA-Komplex mit MALDI-MS zu identifizieren.

Der Komplex wurde entweder im Reflektor-Positiv- oder Negativionen-Modus gemessen. In dem zu erwartenden Massenbereich (ca. 9–14 kDa) war kein einziges Signal zu finden. Auch der DNA-Massenstandard war im Negativionen-Modus sehr undeutlich. Es ist bekannt, dass die DNA und DNA-Addukte sich bei der MALDI-MS viel schwerer positiv ionisieren lassen als reine Peptide. Aus diesem Grund ist die Massenbestimmung der DNA-Addukte sehr erschwert. Um den Anteil der DNA im Komplex zu verringern, wurde das quervernetzte Komplex mit Phosphodiesterasen (PDE I und II) gespalten. Daraus sollte ein kovalentes Peptid-DNA-Addukt resultieren, der maximal 1–2 Desoxynukleotide enthält. Als Kontrolle in den MALDI-MS-Messungen diente das mit Trypsin verdaut und dialysierte ABF1-Protein sowie eine nur PDE I/II enthaltende Probe (Abb. 4-40).

In den erhaltenen Massenspektren lassen sich die meisten Massen diskreten Peptiden zuordnen (Anhang 8.5). Einige Peptide sind in allen drei MALDI-MS-Spektren identisch, wie z. B. Peptide mit der Masse 3141,3 sowie 1987,9 und 1792,9. Die ABF1-Peptide mit den Massen 1191,6 und 1339,8 bzw. 1864,8 sind auch nach der tryptischen Hydrolyse des Quervernetzungsproduktes zu sehen (Abb. 4-40, A und B). Zwei quervernetzte Peptide mit den Massen 1777,9 und 1949,0 sind sowohl vor als auch nach der PDE I/II-Behandlung vorhanden (Abb. 4-40, B und C). Eine Analyse der Peptide zeigt auch, dass ausschließlich negativ geladene Peptide (berechnete Ladung -1 bis -7) im Spektrum des verdauten ABF1-Proteins zu sehen sind. Dies erklärt das Auftreten von freien Peptiden in der Probe des Trypsin-verdauten und mit *QIAEX II*-gereinigten Quervernetzungsproduktes (Abb. 4-40, B). Im *QIAEX II*-Reinigungsverfahren konnte die Bindung der negativ geladenen Peptide leider nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Nach dem Verdau des DNA-Peptid-Komplexes mit PDE I/II sind neue Massensignale zu sehen. Auffallend ist die Entstehung eines intensiven Signals der Masse 999,51, das auf ein Nukleotid-gebundenes Peptid hinweist (Signal 2 in der Abb. 4-40 C). Obwohl die Signale im MALDI-MS-Spektrum überwiegend aus monoprotinierten Peptiden $[M + H]^+$ bestehen, ist die Bildung von Salzaddukten $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$ oder $[M + K]^+$, sowie die Entstehung der biprotinierten Peptidform nicht auszuschließen (Golden *et al.* 1999), (Wu *et al.* 1996). Zwei dem Hauptsignal benachbarte Signale mit Massendifferenzen $+30$ und $+52$ lassen sich nur mit der Entstehung von Salzaddukten erklären. Im Spektrum wurde auch ein Peptid (m/z 737,33) detektiert, das wahrscheinlich der biprotinierten Form des Peptides 4 (m/z 1475,69) entspricht.

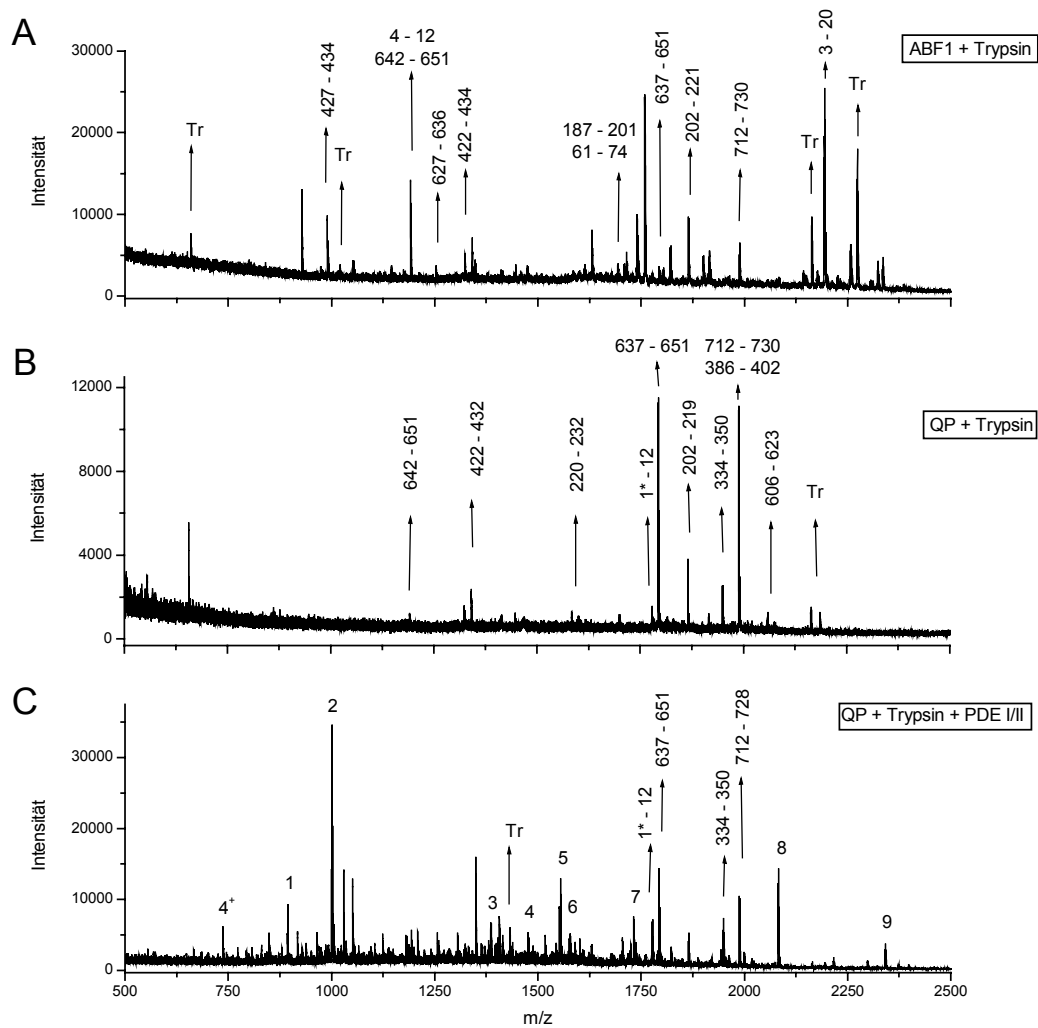


Abb. 4-40 MALDI-MS-Spektren von ABF1- und QP-Fragmenten. Als Matrix diente α -Hydroxycyanozimtsäure in 33 % Acetonitril / 0,1 % Trifluoressigsäure / 50 mM Diammoniumhydrogencitrat. Die Messungen wurden im Reflektor-Positivionen-Modus durchgeführt. A: mit Trypsin behandeltes ABF1-Protein; B: mit Trypsin behandelter, gereinigter ABF1-DNA-Komplex; C: mit Trypsin sowie PDE I/II verdauter, gereinigter QP. Die Zahlen über den Pfeilen entsprechen der Sequenzposition der identifizierten Peptide; Die Zuordnung der Signale 1–9 (C) ist in der Tabelle 4-10 dargestellt. Bei der Bestimmung des 1* – 12 Peptides (B, C) wurde der Einbau von zwei Aminosäuren am N-terminus während der Klonierung des Proteingens berücksichtigt; Peptid 4⁺ entspricht der biprotonierten Form des Peptids 4. PDE: Phosphodiesterase; QP: Quervernetzungsprodukt; Tr: autoproteolytische Trypsinfragmente.

Bei der Analyse der nach Nukleasebehandlung neu entstandenen Signale im Massenspektrum, wurden verschiedene Abbaustadien des DNA-Anteils durch PDE I/II berücksichtigt. So wurde z. B. der mögliche Verbleib des U-Restes als Nukleosid, Nukleotid usw. mit einbezogen (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10 Zuordnung von Signalen der MALDI-MS-Spektren nach der QP-Spaltung mit Trypsin und PDE I/II (Abb. 4-40, C). Die Peptidmasse ergibt sich nach Substraktion der Masse vom DNA-Rest und Ionenaddukt aus der nach MALDI-MS berechneten Masse der Hauptsignale. Alle angegebenen Sequenzen entsprechen den tryptischen ABF1-Fragmenten. P: Phosphat, Q-AS: quervernetzte Aminosäure; QP: Quervernetzungsprodukt; PDE: Phosphodiesterase.

Nr	m/z	DNA-Rest/ Addukt	Peptid-masse	Abwei-chung	Peptid	Position	Q-AS
1	893,43	Uracil	781,9	-0,4	RITTYK	421–426	Y427
		dUdT, P	234,3	+0,1	SK	624–625	
2	999,51	dUMP, dRibose, P	512,5	-	NSHR	55–58	H57
3	1385,71	dUdC, Na ⁺	781,9	-1,8	RITTYK	421–426	Y427
		dU-Nukleosid, Na ⁺	1151,1	-0,6	NDTEDDSINK	187–196	
4	1475,69	Uracil, Na ⁺	1340,7	-1,9	QHLSDITLEER	627–637	H628
5	1551,87	dU	1340,7	-0,2	QHLSDITLEER	627–637	H628
		dUMP, P	1190,6	-0,3	LVVNYEYK	4–12	Y8 Y9 Y11
		dUdC, P	891,5	-0,4	NKVSNSDK	126–133	
6	1575,80	dU, Na ⁺	1340,7	-2,1	QHLSDITLEER	627–637	H628
		dUMP, P, Na ⁺	1190,6	-2,2	LVVNYEYK	4–12	Y8 Y9 Y11
7	1731,88	dUdC	1151,1	-0,8	NDTEDDSINK	187–196	
8	2081,91	Uracil	1970,1	-0,7	LPHEVAEQLRLLSSHLK	643–659	H645 H657
		dUMP, dRibose, P	1594,8	-0,1	ETAQLAIDKINSYK	576–589	Y588
9	2341,10	Uracil	2231,1	-1,1	HQEISSAGTSSNTTKNVNNK	473–493	H473

Ein einziges Peptid-DNA-Addukt, das das Peptid NSHR (55–58) enthält, konnte ohne Abweichung dem Hauptsignal 2 im Massenspektrum zugeordnet werden. Dieses Peptid enthält einen Nukleotidrest, bestehend aus dUMP, Phosphat und Desoxyribose. Von den Peptiden, die nach der PDE I/II-Spaltung neu gebildet wurden, ist es ebenfalls das einzige, das in einem DNA-Erkennung- und Bindungsmotiv lokalisiert ist und die Aminosäure (His) besitzt, die mit IdU eine kovalente Bindung eingehen kann. Das Zn-Finger-Motiv (49–71 AS) von ABF1 kam schon aufgrund der anderen durchgeführten Experimente als potenzielle DNA-Bindedomäne in Frage. Aus den durchgeführten MALDI-MS-Untersuchungen lässt sich schließen, dass His57 des Zink-Finger-Motivs eine kovalente Quervernetzung mit dem IdU-Rest des 27 bp langen Oligonukleotids xl15_8, das aus dem ARS1-Element abgeleitet ist, eingeht. Damit konnte gezeigt werden, dass das Zink-Finger-Motiv von ABF1 eine Kontaktstelle im spezifischen Protein-DNA-Komplex darstellt.

5. Diskussion

5.1. Untersuchung der ABF1-Erkennungsmotive auf dsDNA mittels SELEX-Experimenten

Das *in vitro* Selektions-Verfahren hat nicht nur bei der Charakterisierung der Struktur, Aktivität und Funktion von RNA bzw. DNA eine breite Anwendung gefunden, sondern es eröffnete auch für das Studium von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen neue Möglichkeiten. Obwohl die Bindung von Proteinen an dsDNA, im Hinblick auf die DNA-Struktur, recht einfach erscheint, ist die Interpretation der erhaltenen Daten nicht immer unproblematisch. Dabei kann vor allem die Lage des Bindungsmotivs in den beiden DNA-Strängen die Analyse erschweren (Abb. 5-1). Dies ist dann der Fall, wenn ein Protein nicht ein symmetrisches Motiv erkennt, sondern nur wenige konservierte Nukleotide am Rand des Erkennungsmotivs benötigt, wie im Fall des ABF1-Proteins. Falls mehrere Bindungsmotive vorliegen, können diese sich auf demselben oder dem gegenüberliegenden Strang befinden. So kann es zur kooperativen Bindung oder Inhibition kommen. Die Verteilung der Bindemotive auf beide Stränge kann mit den zugänglichen *Alignment*-Programmen nicht bestimmt werden.

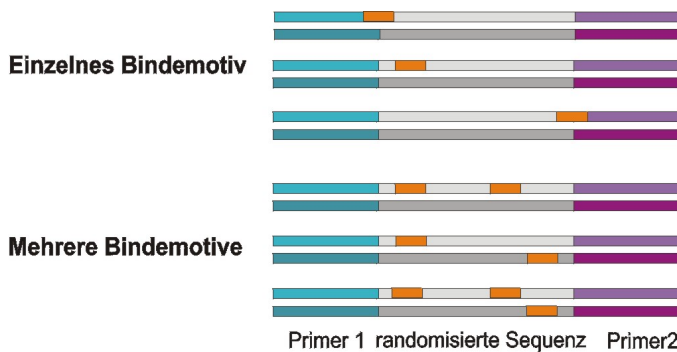


Abb. 5-1 Mögliche Proteinerkennungsmotive und Bindemotivpositionen während der dsDNA-Selektion. Randomisierte Sequenzen sind zwischen zwei Primern in grau, Bindemotive als Vierecke in orange dargestellt.

Deshalb muss angestrebt werden, die Länge der variablen Nukleotide für die dsDNA-Selektion so kurz wie möglich zu halten, um eine Verteilung mehrerer Bindesequenzen auf einem DNA-Strang zu vermeiden. Während der DNA-Selektion mit dem 30N-Pool war es nötig, einen Anhaltspunkt für das Sequenzalignment zu haben. In diesem Fall konnte auf Literaturdaten zurückgegriffen und die Aptamere zuerst in die Gruppen mit und ohne CGT-Motiv eingeteilt werden. Als nächster Schritt wurde eine Einteilung der identischen Sequenzen in Gruppen vorgenommen. Erst dann war die Anordnung der restlichen Sequenzen möglich, wobei die CGT-Motiv-Verteilung auf den beiden DNA-Strängen auch berücksichtigt wurde. Das Zuordnungsproblem entstand durch die große Anzahl an variablen Bindemotiven, die von ABF1 spezifisch erkannt werden konnten. Ermittelte Konsensussequenzen sind in der Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1 Zusammenfassung der identifizierten Konsensusmotive nach der DNA-Selektion. Die Bildung des Konsensusmotivs ist in der Abb. 4-9 schematisch dargestellt.

DNA pool	Zahl der analysierten Sequenzen	Zahl der Sequenzen		Bestimmung des Konsensusmotivs		
		Mit CGT	Ohne CGT	Zahl der verglichenen Sequenzen	Konsensus	Konsensusmotiv
15-I	106	90*		28	K _a	t..tatcGTatt...tGatGt..a.t
				33	K _b	g...TacCGTat..caTGA Tgt.aa
				42	K _c	TacCGTat..catgat.taa
				51	K ₁	Taccgatat...atgatgt
				12	K ₂	gtgtttcgta.tt....a...tt.g
			16		16	K ₃
15-II	109	75**		12	K _d	TCGT...a..tGATg
				20	K _e	ACGTac.aa.tGA.a
				28	K ₆	TCGT.....tGAt
				7	K ₇	TaataGgt.a.gt.tCGT Tcg.agt...c
				6	K ₈	aga.tgtCGtgtcrgtTAtCa.c
				17	K ₉	a..c...cgt a...t
			34***		18	K ₄
			18	K ₅	t.....aa..tcta.cta.....a	
Literatur						CGTnnrrryGAy

* 16 Sequenzen mit der Länge 60–88 bp sind nicht berücksichtigt worden, zwei davon sind Ligationsmutanten – enthalten Primersequenz, restliche 14 Sequenzen sind palindromisch, mit der C₂-Symmetrie. Sequenzen mit einem CGT-Motiv am Sequenzende sind nicht berücksichtigt worden.

** 6 Sequenzen mit der Länge 42–68 bp (Ligationsmutanten) sowie die Sequenzen mit CGT-Motiv am Sequenzende sind nicht berücksichtigt worden.

*** mit den 34 Sequenzen ohne CGT-Motiv sind zwei Aptamere mit CGT-Motiv am Sequenzende analysiert worden.

Die selektierten Aptamere weisen eine ähnliche Variabilität in ihren Sequenzen und den Bindungskonstanten wie die *in vivo* vorkommenden DNA-Motive auf. Das wird besonders deutlich, wenn ein *Alignment* mit in der Literatur beschriebenen Sequenzen aus ARS- bzw. Promotorregionen durchgeführt wird und die Streuungswerte betrachtet werden (Abb. 5-2). ABF1-Bindesequenzen unterscheiden sich schon in den ARS-Elementen recht deutlich. Daher ist es nicht verwunderlich, dass während der dsDNA-Selektion *in vitro* auch eine große Sequenzstreuung entsteht, was sich ebenfalls auf die Bindungsaffinität auswirkt. Auch in der Literatur zur Selektion der DNA-bindenden Motive finden sich entsprechende Beispiele. So weisen – trotz mehrere Selektionszyklen – einige der selektierten, proteinbindenden DNA-Motive bis zu 300fach variable Dissoziationskonstanten auf (Cui *et al.* 1995). Auch bei DNA-Aptameren des bakteriellen IHF-Proteins (*Integration Host Factor*) wurden nach dem neunten Selektionszyklus immer noch solche gefunden, die nicht nur eine sehr hohe Sequenzvariabilität, sondern auch große Unterschiede in der spezifischen Proteinbindung aufweisen; von den 70 untersuchten Aptameren waren nur 28 Protein bindeaktiv.

Diese zeigten eine bis zu 100fach schwächere Wechselwirkung im Vergleich mit der Wild-Typ-DNA (Goodman *et al.* 1999).

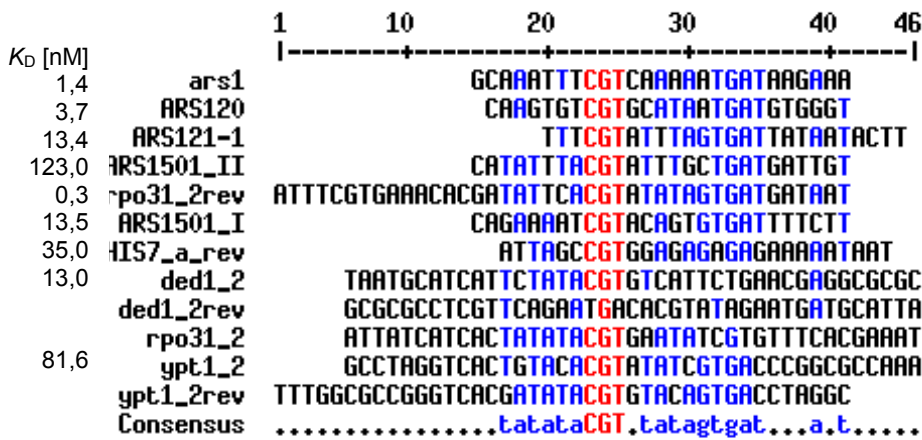


Abb. 5-2 Vergleich der in der Literatur beschriebenen ABF1-Erkennungsmotive. Die Analyse erfolgte mit dem „MultAlin“-Programm; zu 90 % identische Bereiche sind in rot dargestellt, in blau dargestellte Nukleotide kommen zu 50 % vor. rev: reverse Strang; falls beide Stränge das ABF1-Erkennungsmotiv enthalten, wurden beide in die Anordnung einbezogen (ypt_2, rpo31_2, ded1_2).

Selbst nach dem 15. Selektionszyklus (Abb. 4-12) ist der selektierte DNA-Pool heterogen (Tabelle 5-1) und beinhaltet immer noch ca. 10 % (15-I-Pool) bis 30 % (15-II-Pool) solcher Sequenzen, die kein „CGT“-Motiv enthalten und in EMSA nur eine sehr schwache ABF1-Bindung zeigen. Das Verbleiben dieser Sequenzen im DNA-Pool kann nicht verhindert werden. Lediglich die Anzahl dieser unspezifischen Sequenzen ist durch eine Stringenzerhöhung der Bindungs- und PCR-Bedingungen, sowie durch zusätzliche SELEX-Runden, zu verringern (Klug & Famulok 1994). Aus diesem Grund wurde die Salzkonzentration während der Selektion gezielt bis 350 mM erhöht (Tabelle 3-2), um eine unspezifische Bindung der DNA-Aptamere weitgehend auszuschließen.

Die Entstehung von zwei ABF1-DNA-Komplexen (Komplex I und II in der Abb. 4-11) in den ersten SELEX-Zyklen ist entweder durch eine heterogene ABF1-Probe (z. B. ABF1-Fragmente), durch eine Proteindimerisierung oder eine Bindung von zwei DNA-Molekülen zu erklären. Vor allem Helix-Turn-Helix und Zn-Finger enthaltende Proteine neigen zu einer Dimerisierung auf der DNA (Tsai & Reed 1998).

Bei der Selektion sind auch Sequenzmotive identifiziert worden, die länger sind, als die Ausgangs-DNA (Abb. 4-13, Abb. 4-14, Abb. 4-15). Die Entstehung von unterschiedlich langen Aptameren und vor allem von palindromischen Sequenzen ist möglicherweise durch eine fehlerhafte Restriktion oder Ligation zu erklären. Eine andere mögliche Erklärung liefert Frank (Frank 1999), der die Heterogenität der Sequenzlänge des DNA-Pools auf eine Primerhybridisierung im variablen DNA-Bereich während der PCR zurückführt.

Es ist nicht zu erwarten, dass SELEX-Experimente einer Situation *in vivo* entsprechen. Vor allem bleibt der Einfluss von benachbarten Sequenzen während der *in vitro* Selektion unberücksichtigt. Aus diesem Grund wurde die *S. cerevisiae* Genom-Datenbank (<http://genome-www2.stanford.edu>) auf die selektierten Aptamersequenzen überprüft. Bis auf das Aptamer

210 des Pools 15-I, konnte für alle anderen Aptamere eine Homologie zur genomischen DNA gefunden werden. Andere Ergebnisse wurden für das Konsensusmotiv des humanen Proteins Ro52 erhalten. Die selektierten 13 bp Motive (ARGRGGG(G/C)(A/C)GRNGA) weisen nur 50 % Homologie zu drei Promotorregionen aus Eukaryoten auf (Frank 1999) Dagegen ist das 13 bp Motiv der verschiedenen ABF1-bindenden Aptamere fast in allen untersuchten Fällen (14 Sequenzen) entweder zu ORF oder zu nicht translatierten Regionen identisch (Anhang 8.1). Die Auswertung der experimentellen Daten der ABF1-Bindung an diesen Sequenzen, ergibt zwei dominierende Aptamere (8_rev und 4) des Pools 15-I, die 14- und 9-mal im Pool vorkommen und eine noch stärkere ABF1-Bindung (0,06 nM und 0,44 nM) als das *w.t* ARS1-Element (1,4 nM), das als positive Bindungskontrolle diente, aufweisen (Abb. 4-17). Das Erkennungsmotiv 8_rev (CGTAATAACATGAT) scheint besonders günstig für die ABF1-Bindung zu sein. Diese Sequenz befindet sich im Chromosom X in der Promotorregion der Gene, die die 55 kDa Untereinheit der DNA-Polymerase und β -Adaptin in *S. cerevisiae* kodieren (Anhang 8.1).

Das aus der Literatur bekannte ABF1-Erkennungs- und Bindungsmotiv 5'-CGTnnnnrryGAy ist in allen *S. cerevisiae* Chromosomen mehrfach zu finden (Abb. 5-3), was auf die wichtige Rolle der ABF1-DNA-Bindung in zellulären Prozessen hinweist.

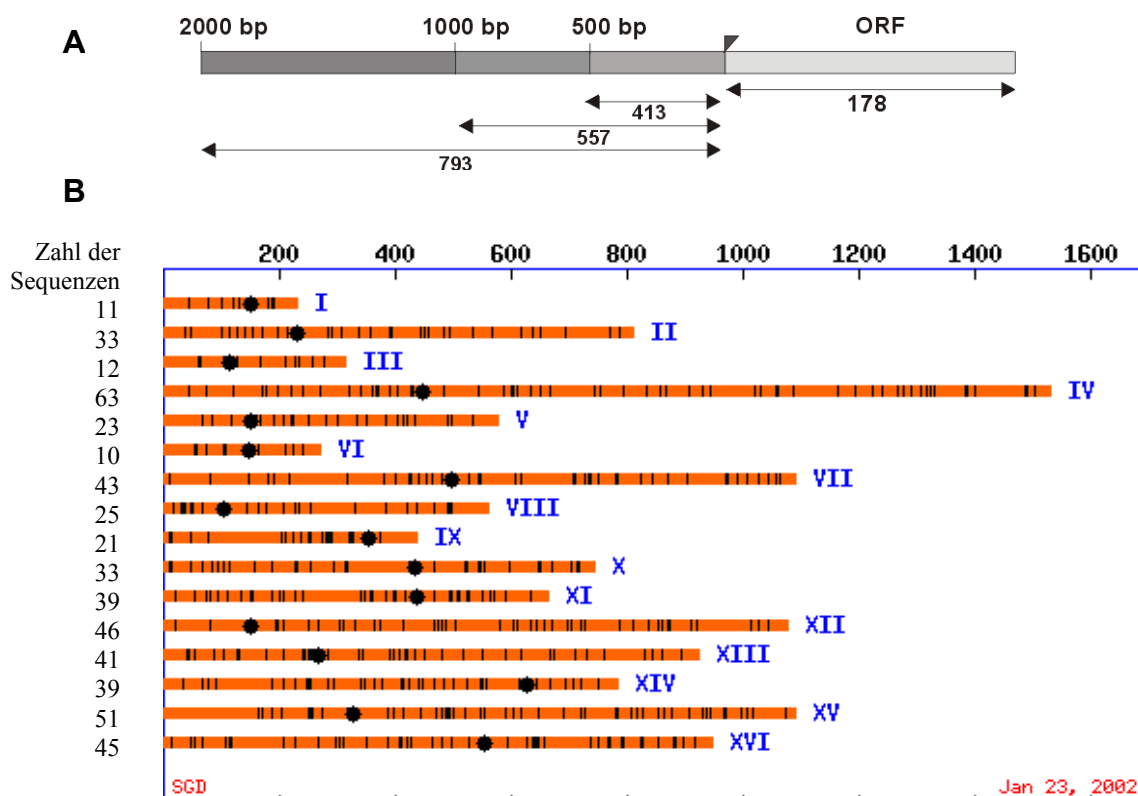


Abb. 5-3 Verteilung des ABF1-Erkennungsmotivs im Genom von *S. cerevisiae*. (A) Anzahl der Proteinbindemotive in ORF- (*open reading frame*) und 500, 1000, 2000 bp von ORF entfernten, nicht translatierten Regionen; (B) schematische Darstellung der Bindemotive und deren Anzahl in Chromosomen; schwarze Striche entsprechen der Sequenzposition auf dem Chromosom; die Zahlen wurden aus der SGD-Datenbank (<http://genome-www2.stanford.edu>) übernommen.

5.2. SPR-Analyse der ABF1-Bindungskinetik

Die SPR-Analyse erlaubt eine zeitaufgelöste Beobachtung der Bindungsreaktion zwischen einem Analyten, der auf einer Chipoberfläche immobilisiert ist, und einem Liganden, der in die Messzelle während der Assoziationsphase, die im Minutenbereich abläuft, injiziert wird. Der Assoziationsprozess wird durch Pufferzugabe in die Dissoziationsphase, die in der Regel 10–20 min dauert, eingeleitet. Für die Messungen mit ABF1 wurde ein 28 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid xl15p verwendet, das die ABF1-Erkennungssequenz des ARS1-Elements enthielt und am 3'-Ende mit Biotin markiert war. Das Oligonukleotid wurde über den Biotinrest auf einen Streptavidin-Chip immobilisiert. Diese Methode erlaubt die ABF1-Bindung bei verschiedenen Proteinkonzentrationen zu verfolgen.

Die Schwierigkeit bei der Auswertung der erhaltenen Daten besteht darin, das richtige *fit*-Modell zu finden. Ein großer Teil der Wechselwirkungen, die mittels SPR-Technik analysiert wurden, weichen von der 1:1 Bindungskinetik ab. Die Ursache dafür kann instrumentell bedingt sein (fluktuierende Flussgeschwindigkeit, instabile Immobilisierung des Liganden), an den nicht optimalen, experimentellen Bedingungen (Heterogenität des Analyten, diffusionslimitierte Bindung, Rebindung des Analyten) liegen oder mit der komplexen Bindungsreaktion (Konformationsänderungen, heterogene Bindungsstellen, „Two state“-Reaktion) verknüpft sein (Khalifa *et al.* 2001).

Der Assoziationsprozess zwischen ABF1 und Oligonukleotid aus dem ARS1-Element gehorchte einer „1:1“-Bindungskinetik, im Gegensatz zur Dissoziation, die zwei exponentiell verlaufende Prozesse enthielt. Dieses Verhalten wurde nicht nur bei den Bindungsuntersuchungen von Topoisomerase I an DNA beobachtet (Pond *et al.* 1997), denn biphasische Dissoziationen sind in mehreren Literaturquellen beschrieben. Je nach Menge der immobilisierten Liganden, der Flussgeschwindigkeit des Puffers und der Proteinaffinität zum DNA-Fragment dauert die schnellere Dissoziationsphase zwischen 10 s (Yamamoto *et al.* 1997) und 500 s (Bondeson *et al.* 1993). Falls die Proteine zwei DNA-Bindedomäne besitzen, verlassen labil bzw. unspezifisch gebundene Proteinmoleküle die Oberfläche mit immobilisierten DNA-Fragmenten sehr schnell und bilden die erste Dissoziationsphase (Seimiya & Kurosawa 1996; Yamamoto *et al.* 1997).

Auch eine Rebindungsreaktion ist als Ursache für eine zweiphasige Dissoziation diskutiert worden (Suh *et al.* 1998). In diesem Fall wird nur der erste Dissoziationsprozess in die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten einbezogen (Jabet *et al.* 2000). Der Rebindungsprozess wurde allerdings nur bei so hohen Proteinkonzentrationen beobachtet, die bei den Messungen mit dem ABF1-Protein nicht verwendet wurden. Gegen eine Rebindungsreaktion während der ABF1-Dissoziation sprechen Bindungsexperimente, die bei Flussraten von 10 und 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Tabelle 8-3) ohne deutliche Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten verliefen. Da die Rebindungsreaktion sowie eine diffusionslimitierte ABF1-Bindung an den Liganden ausgeschlossen werden konnte, wurde für die Berechnung

der Gleichgewichtskonstante nur die zweite Dissoziationsphase, die einer spezifischen ABF1-Oligonukleotid-Wechselwirkung entspricht, berücksichtigt.

Aus dem k_A -Plot (Abb. 4-25) ergibt sich, dass k_{D1} eine Assoziationsreaktion bei niedrigen ABF1-Konzentrationen bestimmt und k_{D2} aus der Bindung höherer (ab 1 nM) Proteinmengen resultiert. Die Ergebnisse der ABF1-Dimerisierungsexperimente (Abb. 4-22) bieten eine Erklärung für die Entstehung von zwei Dissoziationsreaktionen, obwohl nur eine Assoziationsreaktion zu messen ist. Andererseits ist es möglich, dass der DNA-Fragment zuerst unspezifisch vom Protein gebunden wird und erst später eine Proteinbindung am spezifischen Erkennungsmotiv stattfindet (Record *et al.* 1991). Da das untersuchte ARS1-Motiv kurz ist (28 bp), ist hier mit einer größeren Zeitverzögerung, aufgrund Proteinsliding auf der DNA, während der Assoziation nicht zu rechnen. Es ist aber möglich, zugleich eine unspezifische und spezifische DNA-Dissoziation gemessen zu haben. Mit der Erhöhung der NaCl Konzentration steigt der Anteil der ersten k_D , und bei 500 mM lässt sich die Dissoziation mit nur einer exponentiellen Gleichung beschreiben.

Für die spezifische ABF1-Bindung wurde ein K_D -Wert von $0,64 \cdot 10^{-12}$ bei 100 mM NaCl und $55 \cdot 10^{-12}$ bei 350 mM gemessen, der K_D -Wert für die unspezifische Bindung liegt bei 0,15 – 5,39 nM. Vergleichbare Werte wurden für die NK- κ B-DNA-Bindung bestimmt. Mittels SPR-Messung wurde ein K_D -Wert von $1,3 \cdot 10^{-11}$ bei 75 mM KCl bis $5,3 \cdot 10^{-10}$ bei 150 mM KCl für das spezifische NK- κ B-DNA-Fragment erhalten. Dabei wurde nur die zweite Dissoziationsphase ab 500–1000 s berücksichtigt. Ein unspezifisches DNA-Motiv wurde mit einer K_D von 3,3–9,9 nM gebunden (Hart *et al.* 1999).

ABF1-Bindungskinetik mit drei unterschiedlichen DNA-Sequenzen (ARS1, ARS120, ARS121-I) zeigt, dass die Assoziationsgeschwindigkeit nur von der DNA-Sequenz abhängig ist (Abb. 4-32, Tabelle 8-3). Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch ein gewisser Zusammenhang zwischen Oligonukleotid-Länge und Assoziation existiert. Die Beantwortung dieses Problems bleibt offen, da SPR-Experimente mit unterschiedlich langen DNA-Fragmenten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Die Geschwindigkeit der Dissoziation wurde nur durch die Puffereffekte, wie Salz- und Mg^{2+} -Konzentration, sowie äußerliche Faktoren wie Temperatur bestimmt.

Die Bestimmung der K_D -Werte in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 35 °C ermöglichte eine thermodynamische Beschreibung der Bindungsreaktion von ABF1 an das ARS1-Element. Die für die ABF1-DNA-Bindungsreaktion gemessenen Enthalpie- und Entropiewerte stimmen mit den Literaturdaten für die Protein-Bindung an die dsDNA-Fragmente überein und sind negativ für eine spezifische DNA-Bindung (Seimiya & Kurosawa 1996). Bei der spezifischen Protein-DNA-Bindungsreaktion spielt auch die Änderung der Wärmekapazität eine Rolle. ΔC_p von $-5,34 \pm 1,09$ kJ/mol·K (-1275 cal/mol·K), die für die ABF1-ARS1-Wechselwirkung bestimmt wurde, liegt zwischen den Werten, die für die Bindung von zwei Molekülen des Glukokortikoid-Rezeptors (GR-DBD) mit DNA (-1000 ± 200 cal/mol·K)

und von *EcoRI* mit dem GAATTC-Motiv (-1500 ± 800 cal/mol-K) gemessen wurden (Spolar & Record 1994).

In dieser Arbeit wurde die ABF1-ARS1-Bindungskinetik in einem Messsystem durchgeführt, in dem das ARS1-Fragment an der Chipoberfläche gebunden war. Eine andere Möglichkeit, die ABF1-Analyt-Wechselwirkung zu analysieren, wären z. B. SPR-Messungen mit einem ABF1-Fusionsprotein. Ein bindungsaktives ABF1-GST- bzw. ABF1-Bccp-Konstrukt (Bccp = Biotin Carboxyl Carrier Protein) (Suh *et al.* 1999), würde das Spektrum der verwendbaren Methoden deutlich erhöhen und eine stabile Immobilisierung des Proteins auf der Oberfläche ermöglichen. Für die ausgewählten Ziele – kinetische Beschreibung der ABF1-DNA-Bindungsreaktion – stellte die ausgesuchte Immobilisierungsmethode ein stabiles System dar, mit dem eine zeitaufgelöste Beobachtung und Messung der ABF1-DNA-Wechselwirkung möglich war.

5.3. *ABF1-Bindung an die ABF1-spezifische DNA aus S. cerevisiae*

Replikationsprozesse werden im *S. cerevisiae* Genom an spezifischen Stellen – *autonomously replicating sequences* (ARS) – initiiert. Eine der essentiellen Sequenzen der ARS-Elemente ist das ABF1-Erkennungs- und Bindemotiv 5'-CGTNNNNRYGAY, das unabhängig von Orientierung und Distanz funktionsfähig ist (Walker *et al.* 1990). Obwohl dieses Erkennungsmotiv in verschiedenen ARS-Elementen vorkommt, hat der ABF1 eine unterschiedliche Bedeutung für die Funktion dieser Elemente. Bei der Aktivierung des ARS121-Originkomplexes ist das ABF1-Protein durch andere Replikationsaktivatoren nicht ersetzbar. Dies ist im Gegensatz zur Situation bei dem ARS1-Element, dessen Replikation auch durch die anderen Transkriptionsaktivatoren (Gal4p bzw. Rap1) genauso gut aktivierbar ist (Marahrens & Stillman 1992; Wiltshire *et al.* 1997). Vermutlich spielt dabei die Zusammensetzung der ARS-Sequenz und die Positionierung der ORC-Bindungssequenzen (*origin recognition complex*) eine wesentliche Rolle. Bei der Aktivierung der ARS121-Replikation stabilisiert ABF1 zusammen mit OBF2 (HDF), einem Homolog des Säugetier-Ku-Autoantigens, eine spezifische Interaktion des ORC-ähnlichen CBF-Proteins (*core binding factor*) mit ARS121 (Shakibai *et al.* 1996). Im Gegensatz zu ARS121 ist die ORC-ARS1-Interaktion von der ABF1-Bindung unabhängig (Rowley *et al.* 1995). Die ABF1-Funktion bei der Replikationsaktivierung ist in ARS1501 – trotz zweier ABF1-Erkennungsmotive – durch den spezifischen Enhancer REN1501 stark beschränkt (Raychaudhuri *et al.* 1997). Zur Aktivierung der Replikation benötigt die HMRE-ARS nur das Rap1-Protein. Ein synthetisches HMRE-ARS1501 kann trotz des eingebauten spezifischen ABF1-DNA-Bindungsmotivs nicht von ABF1 aktiviert werden (Fox *et al.* 1993). Dies spricht für eine Existenz von verschiedenen Replikationsaktivatorproteinen, die ARS-spezifisch wirken (Raychaudhuri *et al.* 1997).

X-telomerische ARS-Elemente (ARS120, ARS131C, ARS131A) werden genauso gut von dem ABF1 gebunden, wie ARS121- bzw. ARS1-Sequenzen. Das Protein bindet dagegen an die Y-Telomeren-ARS wie z. B. ARS131S deutlich schwächer (Eisenberg *et al.* 1988). In den durchgeführten ABF1-ARS-Bindungsexperimenten liegt die apparente K_D für das ARS120-Element bei 3,7nM und ist mit dem K_D -Wert für die ARS1-Sequenz vergleichbar (1,4 nM).

Die Promotorregionen oder ARS-Elemente, die mehrere ABF1-Erkennungsmotive besitzen, werden von dem Protein tendenziell an einem der Motive viel stärker gebunden, als an dem anderen. Zum ersten Mal wurde dies für den Promotor des Arginase-Gens (CAR1) beschrieben (Kovari & Cooper 1991). Gemessene apparenten Gleichgewichtskonstanten für die ARS121- und ARS1501-Elemente, die zwei ABF1-Erkennungsmotive besitzen, unterscheiden sich ca. 10fach (Tabelle 4-5). Trotz der unterschiedlichen Bindungsaffinität, ist in der Regel die Anwesenheit beider ABF1-Bindemotive für die Aktivierung der Gentranskription essentiell (Jung *et al.* 1995; Yoo *et al.* 1995).

Die Promotorregion des *ded1*-Gens enthält drei ABF1-Erkennungsmotive, die innerhalb eines Bereiches von 27 Basenpaaren liegen. In den Gelretardationsexperimenten wurde gezeigt, dass zwei ABF1-Moleküle in der Lage sind, gleichzeitig an das Erkennungsmotiv zu binden. Die Funktion solcher multiplen Bindestellen in der Transkriptionsaktivierung ist unbekannt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Transkriptionsaktivierung des *ded1*-Gens mit der synergistischen Wechselwirkung von ABF1 mit den anderen DNA-bindenden Faktoren in der Promotorregion zusammenhängt. Besonders das T-reiche DNA-Motiv, in der Nähe der ABF1-Bindungsregion, hat einen positiven Einfluss auf die ABF1-Funktion (Buchman & Kornberg 1990).

In mehreren Bindungsexperimenten wurde die Entstehung des zweiten, im Gel langsam wandernden ABF1-DNA-Komplexes (Abb. 4-19) bei den höheren ABF1-Konzentrationen identifiziert. Über die Bildung des schwachen Komplexes, der aus einem DNA-Fragment und zwei ABF1-Molekülen besteht, wurde in mehreren Arbeitsgruppen berichtet (Buchman & Kornberg 1990; Hiesinger *et al.* 1997). Die Gelfiltrationsexperimente weisen außerdem auf die ABF1-Neigung zur Dimerisierung hin. Damit kann die Entstehung des zweiten radioaktiven Komplexes nach der Bildung der spezifischen ABF1-DNA-Bindung erklärt werden.

Die Untersuchungen mit den selektierten DNA-Aptameren und die Bindungsexperimente mit Promotor- bzw. ARS-Motiven, lassen keinen Zusammenhang zwischen der Protein-Bindungsstärke und dem unterstrichenen variablen DNA-Bereich (5'-CGTNNNNNRYGAY), der zwischen den konservierten CGT- und GA-Sequenzen lokalisiert ist, erkennen. Bei einer systematischen Modifizierung der variablen Region wurde beobachtet, dass der apparente K_D erst beim Austausch von vier dA:dT in vier dC:dG-Basenpaare, ca. 5fach größer wurde, wobei die wt Sequenz des ARS1-Elementes als Vergleich diente. Sogar der Austausch dT→dG und die von Anwesenheit bis zu fünf Fehlpaarungen (dA:dG) beeinträchtigt

die ABF1-DNA-Wechselwirkung viel weniger als erwartet. Die Bindung wurde 3fach (bei einer Modifikation) und bis zu 20fach (bei dem Austausch von fünf Nukleotidpaaren) schwächer, war aber immer noch vergleichbar mit der komplementären dsDNA-Sequenz ARS121-II bzw. 1501-II. Dieses Phänomen ist nur mit einer nicht vorhandenen Aminosäure-Nukleotid-Wechselwirkung in dem analysierten Bereich zu erklären. Andererseits wäre es denkbar, dass nach der Zink-Finger-Bindung am CGT-Motiv, eine partielle Entwindung der helikalen DNA-Struktur stattfindet und aufgrund der Abstandsänderung neue Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und Nukleotiden, mit einer deutlichen Stabilisierung der Struktur, entstehen.

Die hohe Nukleotidvariabilität im Zentrum des ABF1-Erkennungsmotivs 5'-CGTNNNNRYGAY spricht für ein hohes Anpassungspotenzial des ABF1 bei der DNA-Bindung. Die T13A Mutation im *hop1*-Promotor führt zu einer Inaktivierung der Bindungskapazität (Gailus-Durner *et al.* 1996). Andererseits reduziert die Mutation G11T das DNA-Bindungspotential deutlich, beeinflusst aber kaum die Transkriptionsaktivierung, denn sie kommt in dem *L2B*-Promotor des ribosomalen *L2*-Gens *in vivo* vor (Della Seta *et al.* 1990a). Eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen, eine hohe DNA-Affinität und/oder ein großer ABF1-Überschuss in der Zelle erhöht wahrscheinlich die ABF1-Toleranz gegenüber Punktmutationen in der Erkennungssequenz *in vivo*.

5.4. Vergleich der Methoden für die Untersuchung der Protein-DNA-Bindung

Für die Bestimmung von Protein-DNA-Gleichgewichtskonstanten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Je nach der Zielsetzung des jeweiligen Versuchs kommen verschiedene Methoden wie EMSA, Filterbindungstest, SPR- und Fluoreszenzmessungen für die Charakterisierung der Protein-Protein- bzw. Protein-DNA- oder der Protein-RNA-Wechselwirkung zur Anwendung. Ein Vergleich der am meisten verwendeten Bindungsverfahren zur Charakterisierung der Protein-DNA-Bindung ist in Tabelle 5-2 dargestellt.

Trotz der Hinweise in der Literatur, dass die Bindungsaffinität, die mittels BIACORE und Mikrokalorimetrie detektiert wurde, mit Ergebnissen von Radioimmuntests (RIA) übereinstimmt (Malmqvist & Karlsson 1997), stellte sich in der Praxis heraus, dass die K_D -Werte aufgrund unterschiedlicher Messmethoden sehr stark variieren. So sind mittels SPR bestimmte K_D -Werte nicht immer mit den Gelretardations-, bzw. Filterbindungsdaten vergleichbar (Yang *et al.* 1995). Die mit SPR-Messungen berechneten Konstanten sind nicht nur von der Immobilisierungstechnik des Liganden abhängig. Allein die linearisierte und nicht-linearisierte Auswertung der SPR-Kurven liefert unterschiedliche Ergebnisse. Aus diesem Grund variieren die SPR- K_D -Werte der Bindung des EGF's (Epidermal Growth Factor) mit seinem Rezeptor (sEGFR) zwischen 278 und 382 nM (Nice & Catimel 1999). Die Bindungsbedingungen während der SPR-Messung haben ebenfalls einen Einfluss auf die Re-

aktionskonstanten. Für die Antigen-Antikörper-Bindung wurde ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Assoziationsdauer und der Absenkung der Dissoziationsreaktionsgeschwindigkeit gezeigt (Lipschultz *et al.* 2000).

Tabelle 5-2 Vergleich der Methoden für die Untersuchung der Protein-DNA-Wechselwirkung. Nach (Bondeson *et al.* 1993), (Rehm, 1997).

Methode	Vorteile	Nachteile
EMSA	Kinetische Messung begrenzt möglich; Info über Struktur des Protein-DNA-Komplexes; Bindungstest mit Zellextrakt;	Messung des Gleichgewichtszustandes; radioaktive Markierung der DNA-Fragmente; Dissoziation des schwachen Komplexes während der Elektrophorese
Filterbindungstest	Kleine Proteinmengen (ng); schnell; billig, effiziente Abtrennung des freien Liganden	Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente; nicht vollständige Adsorption und Auswaschen des spezifisch gebundenen Liganden bei schneller „off-rate“ möglich; hohe unspezifische Bindung
Fluoreszenz-anisotropie	Schnell; keine radioaktive Markierung der DNA-Fragmente; Änderung der physikalischen Reaktionsparameter (T , pH , c_{Salz});	Markierung einer der Bindungspartner; Messung des Gleichgewichtszustandes; größere Proteinmengen (μg);
SPR	Reelle Bindungskinetik; programmierbar; geeignet auch bei niedriger Bindungs-affinität; Messung von 1–3 Proben gleichzeitig; Änderung der physikalischen Reaktionsparameter (T , pH , c_{Salz}); präzise und schnell; breites Spektrum der Immobilisierungsmöglichkeiten des Liganden; keine radioaktive DNA-Markierung; Bindungskinetik von spezifischem Protein aus einem Proteinextrakt;	Größere Proteinmengen (μg); komplizierte Auswertung bei Abweichung von 1:1 Bindung; einer der Bindungspartner ist immobilisiert; lange Einarbeitungszeit (1–2 Wochen); schwierig für kleine Liganden ($M_r < 5000$); Konformationsänderung während der Ligandenkopplung; teure Chips;

Die Immobilisierung eines Bindungspartners an der Oberfläche eines Sensor-Chips führte tendenziell zu niedrigeren K_D -Werten während der SPR-Messung im Vergleich zu den anderen Methoden. Dies gilt vor allem für eine hochaffine Protein-DNA-Bindung. Webster berichtet über einen 10fachen Unterschied in der HMG-I/Y-DNA-Gleichgewichtsdissoziationskonstante aus SPR- und *Gelshift*-Messungen (Webster *et al.* 2000). Auch für die Tus-Bindung (Replikation Terminator Protein in *E. coli*) an die spezifische DNA (*TerB*) in 100 mM KCl-Puffer (pH 7,5) wurde eine $K_D < 1$ pM mit SPR- und ca. 10 pM mit dem Nitrozellulose-Bindungstest (NZBT) bestimmt. Für die unspezifische Tus-DNA-Bindung wurden mit den beiden Methoden fast identische Werte berechnet: 0,1 μM (SPR) und 0,3 μM (NZBT) (Guajardo & Sousa 1999; Neylon *et al.* 2000). Allein die Durchführung des Filterbindungstests in verschiedenen Puffern (z. B. Chlorid und Glutamat) führt zu einem gewissen Unterschied in der Bindungskinetik. Glutamationen begünstigen die Protein-DNA-Bindung (Record *et al.* 1991), was einen K_D -Wert von 0,34 pM für die Tus-*TerB*-Bindung in einem Glutamatpuffer (pH 7,5) (Gottlieb *et al.* 1992) gegenüber ca. 10 pM im KCl-Puffer (Guajardo & Sousa 1999) erklärt. Andererseits stimmen die Geschwindig-

keitskonstanten für die Bindung von Furanderivaten an DNA die durch Fluoreszenzspektroskopie- und SPR-Messung erhalten wurden (Mazur *et al.* 2000), ebenso überrein, wie die K_D -Werte, die für die Lipopolysaccharid-Peptid-Interaktion nach der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) und SPR-Messung erhalten wurden (Leatherbarrow & Edwards 1999). Im Gegensatz dazu, ist der mittels SPR-bestimmte K_D -Wert für BAG1-HSP70-Bindung 5fach höher (Stuart *et al.* 1998), für DNA-Triplexbildung 20fach niedriger (Asensio *et al.* 1998), als der aus ITC-Messungen resultierende. Aus den vorhandenen Literaturdaten ist keine Schlussfolgerung möglich, welche die optimale Methode ist, um die Wechselwirkung zwischen den Molekülen am besten zu charakterisieren und mit welcher die Ergebnisse aus den verschiedenen Messmethoden eindeutig vergleichbar sind. Tendenziell stimmen die K_D -Werte, die nach den unterschiedlichen Verfahren erhalten wurden, nur für die schwach bindenden Moleküle überrein.

Während dieser Arbeit wurden zwei Methoden für die K_D -Bestimmung angewandt. Die SPR-Messung der Reaktionskinetik mit BiacoreX erwies sich als eine zeitaufwendige Methodik, die aber sehr hilfreich ist, um die Bindungskinetik und den Einfluss der physikalischen Parameter auf die Wechselwirkung zwischen ABF1 und DNA zu bestimmen. Für die Bindungsanalyse mehrerer DNA-Sequenzen wurde der Gelretardationstest bevorzugt verwendet. Ein Vergleich der bestimmten Gleichgewichtskonstanten ist in der Tabelle 5-3 dargestellt.

Tabelle 5-3 Vergleich der mit verschiedenen Methoden bestimmten Gleichgewichtskonstanten der ABF1-DNA-Bindung. RT: Raumtemperatur. Aus der SPR-Messung wurden nur K_{D2} für die ABF1-DNA-Bindung berücksichtigt.

Komplex	Methode	T [°C]	c_{NaCl} [mM]	K_D [nM]
ABF1-ARS1	EMSA	4	50	0,7
		RT	50	1,4
		RT	50 + 5 mM MgCl ₂ + 0,5 mM CaCl ₂	6,2
	SPR	10	200	0,04
		25	200	0,08

Das ABF1-DNA-Bindungs-gleichgewicht ist sehr stark von den Bedingungen im EMSA-Verfahren abhängig. So schwächt die Zugabe von Mg²⁺ und/oder Ca²⁺ die Bindung etwa 4fach. Die Bindungskonstanten, die mittels EMSA bestimmt wurden, unterscheiden sich ca. 20fach (Tabelle 4-5) von der K_{D2} , die nach der SPR-Messung berechnet wurde (Tabelle 5-3, Tabelle 8-3). Eine Temperaturänderung beeinträchtigt den Gleichgewichtszustand der Bindungsreaktion während der SPR-Messung nicht sehr deutlich. In der Literatur wurde für die ABF1-DNA-Komplexbildung eine Halbwertszeit von 15 min und K_D gleich 1 nM bestimmt (Gailus-Durner *et al.* 1996), was mit den durchgeführten EMSA-Messungen übereinstimmt.

Interessanterweise wurden bei der SPR-Messung der ABF1-DNA-Bindung zwei Dissoziationsprozesse beobachtet. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass ein mehrstufiger Bindungsprozess während der apparenten K_D -Bestimmung mittels EMSA oder Fluoreszenzanisotropiemessung nicht aufgelöst wird und eine einstufige Bindungsreaktion gemessen wird. Denn mit der empfindlicheren SPR-Untersuchung ist es möglich, zwei Prozesse zu trennen und mit der daraus resultierenden zweiten K_D die spezifische ABF1-DNA-Bindungsreaktion zu beschreiben. Obwohl mehrere Arbeitsgruppen das Phänomen der zweistufigen Dissoziationsreaktion und unterschiedliche K_D -Werte, die mittels SPR und anderer Methoden berechnet wurden, beobachteten, ist eine einheitliche Erklärung der großen Differenzen in der K_D -Bestimmung mittels SPR noch nicht vorhanden.

5.5. Einfluss der DNA-Methylierung auf die Protein-Bindung

In Prokaryonten wird die zelleigene DNA durch Methylierung der Erkennungsstellen vor Restriktions-Endonukleasen geschützt. In Eukaryonten ist die DNA-Methylierung mit den zentralen zellulären Prozessen, wie DNA-Reparatur, Transkription, Regulation der Entwicklungsprozesse, Chromatinorganisation verknüpft (Adams 1990; Wade 2001; Wolffe 2000). Die eukaryontischen DNA-Methylasen erkennen kurze CG- oder CNG-Motive und bevorzugen häufig hemimethylierte DNA als Substrat. Der Mechanismus, nach dem die CpG-Methylierung zur Repression der Transkription führt, ist nicht bekannt. Beim *Gene-Silencing* spielt wahrscheinlich eine Familie von Proteinen, die eine Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) enthält, eine wichtige Rolle. Eine Demethylierung der DNA ist mit einer Entfernung der MBD-Proteine, der Acetylierung der Histone H3 und H4 sowie einer Transkriptionsaktivierung verknüpft (Drewell *et al.* 2002; El Osta *et al.* 2002; Stimson & Vertino 2002).

Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihr zugehöriges DNA-Element kann durch DNA-Methylierung verstärkt werden. Mit Hilfe eines Protein-Selex-Verfahrens gelang es, Zn²⁺-Finger Domänen des Transkriptionsfaktors Zif268 zu isolieren, die eine bis zu 30fach höhere Affinität zu methylierter DNA aufweisen (Isalan & Choo 2000). Andererseits aktiviert der Transkriptionsfaktor Sp1 die Genexpression unabhängig vom Methylierungszustand des Promotors (Gaston & Fried 1995).

Der gut charakterisierte Cys₂-His₂ Zink-Finger erkennt drei asymmetrische Basen in der DNA pro Zn-Finger-Motiv (Kamiuchi *et al.* 1998). Die Aminosäuren des Zn-Fingers binden an den CG-reichen DNA-Strang bevorzugt in der großen DNA-Furche. Durch eine Positionierung der Methyl-Gruppe in der großen DNA-Furche kann die Zugänglichkeit der Zink-Finger zum Cytosin gestört sein, weshalb auch die Bindung an die DNA deutlich geschwächt wird (Wolffe 2000). Zn-Finger-Strukturen sind in der Lage, einen 5-Methyl-dC-Rest spezifisch von dC und dT zu unterscheiden, was in der Zelle als Schalter für eine spezifische Protein-DNA-Bindungsreaktion benutzt wird. Da die untersuchten Zn-Finger-Motive, trotz vorwiegender Bindung an einem DNA-Strang, auch noch einzelne Kontaktpunkte mit

der Base aus dem komplementären Strang bilden, unterscheidet das Protein ein 5-mC:G Basenpaar von T:A, falls die Bindung im nicht methylierten Strang stattfindet (Isalan & Choo 2000; Suzuki *et al.* 1994). Die Experimente zur Bindung des ABF1-Proteins an methylierte DNA zeigen ebenfalls, dass ein Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der ABF1-Bindungsaffinität besteht (Tabelle 5-4).

Methyliertes Nukleotid	K_D , nM
12_10	0,1
10	0,2
12	0,4
wt	0,7
9	4,4
19	11,5
12_19	16,0
9_10	20,4
9_19	21,8

Tabelle 5-4 Einfluss der Methylierungsposition auf die ARS1-ABF1-Bindungsaffinität. ARS1-Sequenz: 5'- GCA-AATTCCGTCAAAAATGAATAAGAAAC, fett gedruckte Nukleotide (Position 9 und 12) wurden am angegebenen Strang, unterstrichene (Position 10 und 19) auf dem Gegenstrang modifiziert. Die Inkubation der Bindungsansätze erfolgte in Bindungspuffer HOO5 (pH 7,5) für 10 min bei +4°C. K_D (apparente Dissoziationskonstante) wurde nach Michaelis-Menten-Gleichung aus den Bindungskurven berechnet. wt: wild Typ DNA-Sequenz

Eine Methylierung an der Position 10 und 12 stabilisiert den ABF1-DNA-Komplex, während die Methylierung an der Position 9 und 19 die ABF1-Bindung schwächt. IdU-modifizierte Oligonukleotide an der Position 8 und 21 der ARS1-Sequenz wurden – im Vergleich zu allen anderen IdU modifizierten Positionen der ARS1-Sequenz – während der UV-Bestrahlung mit ABF1 mit den höchsten Ausbeuten quervernetzt (diese Arbeit und N. Dank, 1997). Dies zeigt, dass die Nukleotide 9 und 19 des ARS1-Motivs höchstwahrscheinlich als Kontaktpunkte im ABF1-ARS1-Komplex dienen.

5.6. Bestimmung der Kontaktpunkte im ABF1-DNA-Komplex

Das ABF1-Erkennungsmotiv 5'-CGTNNNNRRYGAY-3' ermöglicht eine spezifische DNA-Protein-Wechselwirkung. Wird zwischen den zwei konservierten Motiven (unterstrichen dargestellt) eine Base eingefügt oder deletiert, ist die DNA-Bindung stark reduziert. Obwohl mittels SELEX-Experimente die sieben variablen Nukleotide genauer identifiziert werden konnten, bleibt unklar, wieviel die Sequenz zwischen den zwei konservierten Motiven für eine spezifische DNA-Erkennung beiträgt.

Das ABF1-Protein besitzt zwei potenzielle DNA-Bindungsdomänen, ein essentielles Zink-Finger-Motiv (49–71 AS) und ein Helix-Turn-Helix-Motiv (323–496 AS) (Cho *et al.* 1995). Da bis jetzt keine ABF1-Strukturanalyse durchgeführt wurde und nur zwei Sequenzen von homologen Proteinen aus *K. lactis* und *K. marxianus* bekannt sind, ist die ABF1-DNA-Wechselwirkung strukturell nicht beschrieben. Mit Hilfe des UV-Laser vermittelten *zero-length Photocrosslinkings* besteht die Möglichkeit, kovalente Protein-DNA-Komplexe zu bilden und nach Spaltung des Komplexes und anschließender Peptidsequenzierung eine DNA-kontaktierende Aminosäure zu identifizieren. Die chemische Spaltung des querver-

netzten ABF1-DNA-Komplexes mit Hydroxylamin und NTCB wies bereits auf das Zink-Finger-Motiv als potenzielle DNA-Bindungsstelle hin. Die nach der Spaltung entstandenen Peptid-DNA-Fragmente (Länge 20–30 kDa) können nur aus der N-terminalen Proteinregion stammen (Abb. 5-4).

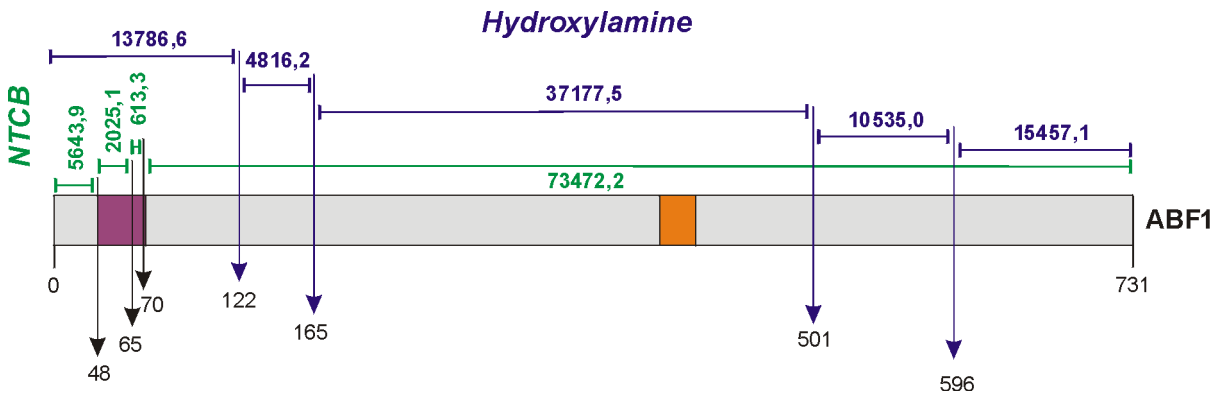


Abb. 5-4 Bildung der ABF1-Peptide nach der chemischen Spaltung mit NTCB und Hydroxylamin. Die Pfeile zeigen auf die Spaltungsposition; Zahlen zwischen den Pfeilen entsprechen dem Peptidmolekulargewicht (Da). Mit NTCB erzeugte Spaltungsprodukte sind grün, mit Hydroxylamin erhaltene Fragmente blau dargestellt. Die Zn-Finger- (Position 49–71) und Helix-Turn-Helix- (Position 397–417) DNA-Bindemotive sind wiedergegeben.

Das größte Hindernis der MALDI-MS-Untersuchung bestand darin, größere Mengen an sauberem quervernetztem Peptid zu gewinnen. Ein 20facher Überschuss an Protein in der Quervernetzungsreaktion, niedrige Reaktionsausbeuten (ca. 3–7 %) und die negative Ladung des Proteins ($pI = 4,7$) erschwerten die Trennung des quervernetzten Produkts von der ungebundenen DNA und dem frei vorliegenden Protein bzw. Peptid.

Zur genauen Bestimmung der kontaktierenden Aminosäure wurde ein quervernetzter ABF1-DNA-Komplex in präparativem Maßstab dargestellt und nach Proteaseverdau im MALDI-MS analysiert. Nach der MALDI-MS-Analyse des Trypsin-verdauten Quervernetzungsproduktes wurde ein Peptid-DNA-Adukt identifiziert, das einem NSHR-Peptid aus dem Zink-Finger entspricht und vermutlich über eine Quervernetzung des His57 mit IdU während der UV-Bestrahlung entstanden ist. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis führten die Mutationen His57 \rightarrow Gln bzw. Cys71 \rightarrow Ser zu einem Verlust der DNA-Bindungsaktivität (Halfter *et al.* 1989a). Damit wurde gezeigt, dass die Aminosäuren des Zink-Finger-Motivs mit der DNA wechselwirken.

Das Zink-Finger-Bindungsmotiv des ABF1's gehört zu den nicht vollständig charakterisierten CHCC-Zink-Finger-Strukturen. Daher ist auch ein Vergleich mit anderen Zink-Fingern und eine Modellierung der die DNA kontaktierenden Aminosäuren erschwert. Der ausführlich untersuchte Zink-Finger des Typs C_2-H_2 erkennt drei asymmetrische Basen der DNA pro Zn-Finger-Motiv (Kamiuchi *et al.* 1998). Anhand der Kristallstrukturen DNA-bindender Proteine, die ein C_2-H_2 Zink-Finger-Motiv enthalten und zwei antiparallele β -Faltblätter und eine α -Helix pro Zink-Finger bilden, wurden die Zink-Finger-Strukturen dieses Typs in zwei Gruppen eingeteilt. Der „Standard“-Zink-Finger (Transkriptionsfaktor Zif268) bildet basen-

spezifische Kontakte zwischen den Aminosäuren –1, 2, 3 und 6 der α -Helix des Zn-Fingers und vier Nukleotiden der Erkennungssequenz aus. Motive, die vom „Zif268-Modell“ abweichen, kontaktieren über die -1. und 2. Aminosäure der α -Helix mit anderen Nukleotiden als der „Standard“-Zink-Finger. Die Kontaktpunkte zwischen der Aminosäure 3 und 6 sind in beiden Gruppen identisch. His 7 der α -Helix interagiert oft (zu 80 % der analysierten Fällen) über N δ mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende des Erkennungsmotivs. In 60 % der Fälle ist Lys oder Arg aus einem β -Faltblatt für die Bindung mit einer Phosphatgruppe verantwortlich. Falls sich ein Histidin an der 3. Position der α -Helix befindet, verstärkt es die Bindung mit DNA über eine Wasserstoffbrücke zwischen N ϵ und N7 des Guanins und über Van-der-Waals-Interaktion mit der Methylgruppe des benachbarten Thymidins (Suzuki *et al.* 1994; Wolfe *et al.* 2000).

Eine Sekundärstrukturvorhersage (<http://www.expasy.ch/tools/#secondary>) legt nahe, dass das Zink-Finger-Motiv von ABF1 aus einer $\beta\alpha\beta\alpha$ Struktur besteht, wobei die 7. Position der ersten α -Helix – wie beim Zink-Finger C₂-H₂-Typ – mit His besetzt ist. Basierend auf den Daten für C₂-H₂-Zink-Finger und den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ein Modell für die ABF1-DNA-Kontaktpunkte im Bereich des Zn-Fingers formulieren (Abb. 5-5).

Nach diesem Modell erkennt das Zink-Finger-Motiv drei Basen – das CGT-Motiv. Das His57 der 3. Position der α -Helix interagiert mit dem Desoxyguanosin (Isalan & Choo 2000; Suzuki *et al.* 1994) und vermutlich mit dem Iod in IdU, was zu einer Quervernetzung führte. Der Wechselwirkungspartner für dC9 ist unbekannt (Wolfe *et al.* 2000). Möglicherweise wechselwirkt K60 mit dC9 und S56 mit dG12. Vor allem Serin gilt als eine unspezifische Aminosäure bei der Bindung an DNA. Histidin ist ebenfalls in der Lage, alle vier Basen zu binden, bevorzugt aber dG. Lysin bindet an dG am stärksten (Suzuki *et al.* 1994). Aus den bekannten Modellen geht hervor, dass dG10 durch His oder Lys und dT11 durch Leu oder Ser gebunden sein kann. Lys aus der Position –1 hätte auch mit dG10 wechselwirken können (Wolfe *et al.* 2000). Im analysierten Fall mit ABF1 ist keine eindeutige Zuordnung der Kontaktpunkte für die Aminosäuren -1 und 2 der α -Helix möglich. Dies spricht für eine nicht-standardmäßige Zinkfingerstruktur des ABF1-Proteins. Daher ist es nicht auszuschließen, dass der ABF1 noch andere Kontakte im Erkennungsmotiv und benachbarten Nukleotiden ausübt. Aus den Gelretardationsexperimenten folgt, dass eine Methylierung der Basen 10 und 12 keinen signifikanten Einfluss auf die ABF1-Bindung an ARS1 ausübt. Die Positionen 9 und 19 wurden dagegen als essentiell für die Wechselwirkung mit dem Zink-Finger-Motiv identifiziert, da eine Methylierung diesen Basen zu einer ca. 30fachen Minderung der ABF1-Bindungsstärke führt.

Die Quervernetzungsausbeute des ABF1-ARS1-Komplexes ist – im Vergleich mit den anderen Protein-DNA-Komplexen – recht niedrig (Holz *et al.* 1999; Meisenheimer & Koch 1997). Aus der Literatur ist bekannt, dass His – im Vergleich zu den aromatischen Aminosäuren Phe, Trp und Tyr – nur mit niedrigen Ausbeuten durch UV-Licht quervernetzt wird. Hohe Quervernetzungsausbeuten wurden vor allem in solchen Systemen erhalten, bei denen die

DNA als Einzelstrang oder als flexibler Doppelstrang vorlag. In diesen Fällen findet meist eine Stapelwechselwirkung der Seitenketten von aromatischen Aminosäuren mit den Basen der einzelsträngigen bzw. strukturell deformierten DNA statt, wodurch eine Photoquervernetzung begünstigt wird. Eine solche Situation trifft offenbar für den ABF1-Komplex mit dem ARS1-Fragment nicht zu.

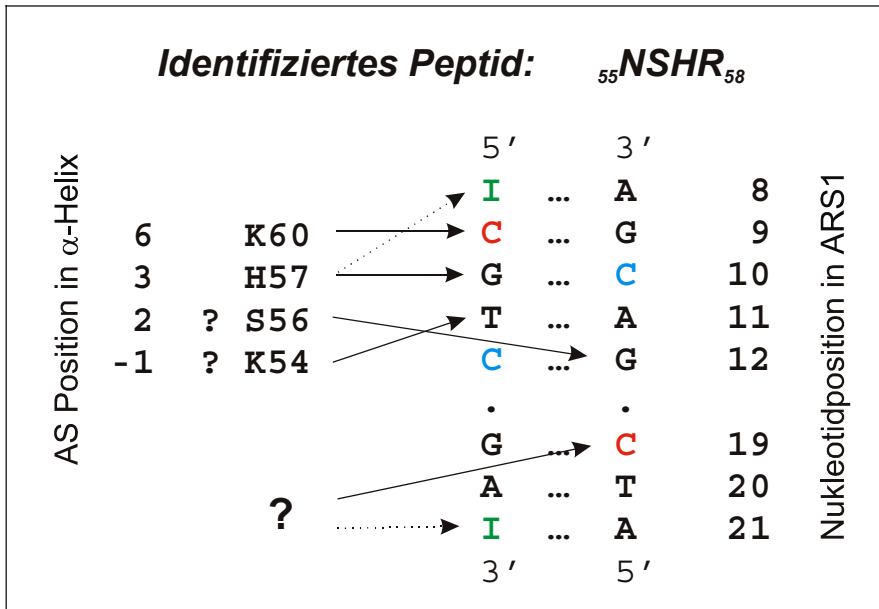


Abb. 5-5 Modell der Kontaktpunkte zwischen dem Zink-Fingermotiv vom ABF1-Protein und dem 27 bp langen ARS1-Element. Die Pfeile zeigen eine Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren (AS) und Basen. Quervernetztes Nukleotid (I), methylierungsempfindliche (C) und -unempfindliche (C) Basen sind markiert.

Die ABF1-Domäne, die an das GAT-Motiv bindet, ist nicht bekannt. Die mit IdU-8-Oligonukleotid vergleichbar niedrige Quervernetzungsausbeute der mit IdU-21 modifizierten DNA und ein starker Methylierungseinfluss des dC19-Nukleotides spricht für einen direkten Aminosäurekontakt mit der dC19-Base und mögliche Positionierung des Histidins in der Nähe vom 21. Nukleotid in der ABF1-Erkennungssequenz des ARS1-Elementes.

Das HTH (*Helix-Turn-Helix*)-DNA-Bindungsmotiv ist oft nicht in der Lage eine stabile Domäne zu bilden, und übt seine Funktion eher in Gegenwart von anderen DNA-Bindungsdomänen aus (Pabo & Sauer 1992). Die meisten DNA-bindenden Proteine enthalten mehrere Zink-Finger-Motive, die für die Affinität und Stabilität der Bindung mit DNA sorgen. Da zugleich ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zink-Finger und der Affinität des Protein-DNA-Komplexes besteht (Wolfe *et al.* 2000), ist es nicht auszuschließen, dass das HTH-Motiv (397–417 AS) im ABF1-Protein einen gewissen Beitrag zur Qualität der Bindung leistet. Ohne Röntgenkristallstrukturanalyse lässt sich aber noch keine Schlussfolgerung über den genauen Erkennungsmechanismus und die ABF1-Positionierung auf der DNA ziehen.

6. Zusammenfassung

Das ABF1-Protein aus *S. cerevisiae* ist als ein multifunktionseller, dsDNA-bindender Transkriptionsfaktor bekannt, der nicht nur Transkriptionsprozesse in der Zelle reguliert, sondern auch an der DNA-Replikation und einer Nukleosomen-Rekonfiguration bzw. Änderung der Chromatinstruktur beteiligt ist. Da das Protein in verschiedenen Zusammenhängen immer wieder gefunden wurde, kann man davon ausgehen, dass es in den Zellprozessen eine essentielle Rolle spielt. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, den zentralen Punkt der ABF1-Funktion – nämlich die Erkennung und Bindung des zugehörigen DNA-Elements – zu untersuchen und zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Experimente zur Klärung dieser Fragen verwendet, wobei ein besonderes Augenmerk auf der Identifizierung der Kontaktpunkte lag. Die Experimente stützen sich auf die Literaturdaten über das spezifische DNA-Erkennungsmotiv 5'-CGTNNNNRRYGAY (konservierte Nukleotide sind unterstrichen) sowie über die strukturellen Domänen von ABF1 (Zink-Finger-Motiv, Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) und C-terminale Transaktivierungsdomäne).

Mittels Gelretardationsexperimenten mit verschiedenen DNA-Sonden wurde gezeigt, dass ABF1 einen richtungsorientierten DNA-Bindungsmechanismus aufweist und eine Neigung zur Oligomerisierung besitzt. Die DNA-Bindungsaffinität ist stark von der Sondenlänge abhängig – die Verkürzung des DNA-Fragments von 27 auf 20 bp verringert die Bindung um eine Größenordnung –, die Zusammensetzung des variablen Bereichs des Konsensusmotivs hingegen beeinflusst die Bindung nur geringfügig. Offenbar finden nur wenige ABF1-DNA-Kontakte im variablen Bereich statt, wie durch fehlgepaarte ARS1-Fragmenten nachgewiesen werden konnte. Um das ABF1-Erkennungsmotiv einzuschränken bzw. besser zu beschreiben, wurde ein *in vitro* DNA-Selektionsverfahren (SELEX) eingesetzt. Mit diesem Ansatz wurden zwei dsDNA-Aptamere identifiziert, die am häufigsten im selektierten DNA-Pool vorkommen und eine bis zu 20fach höhere DNA-Bindungsaffinität im Vergleich zu einem ARS1-Fragment aufweisen. Von den selektierten ABF1-Erkennungsmotiven konnten die meisten im *S. cerevisiae* Genom wiedergefunden werden. Die Sequenzanalyse der selektierten Aptamere führte zur Erweiterung des Konsensusmotivs (5'-TACCGTATNNNATGATGT) im Vergleich zur bisher formulierten ABF1-Erkennungssequenz 5'-CGTNNNNRRYGAY.

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wurde die ABF1-DNA-Bindungsreaktion in Bezug auf Thermodynamik und Kinetik genauer charakterisiert. Anhand der im analysierten Temperatur- (10–35°C) und Salzkonzentrationsbereich (100–300 mM NaCl) gemessenen Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten konnten auf die Bildung von 6–7 ionischen Kontakten bei der spezifischen ABF1-ARS1-Wechselwirkung geschlossen werden. Dabei ist die Dissoziationsgeschwindigkeit sehr stark

von der Ionenstärke abhängig. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_A dagegen ist nur wenig von den externen Bedingungen abhängig, zeigt aber – im Gegensatz zu k_D – eine deutliche Sequenzspezifität. Aus der Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parametern lässt sich schließen, dass die ABF1-DNA-Bindung bei physiologischen Temperaturen eine enthalpiekontrollierte Reaktion darstellt.

In der ABF1-Struktur sind das Zink-Finger- sowie das HTH-Motiv als potenzielle DNA-Bindungsdomänen bekannt. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der DNA-Bindedomäne sowie die Identifizierung von den DNA-kontaktierenden Aminosäuren. Dafür wurde ein 27 bp langes, I⁵dU-substituiertes ARS1-Fragment mit ABF1 durch UV-Bestrahlung quervernetzt. Ein limitierter Trypsin-Verdau des Quervernetzungsprodukts sowie die Ergebnisse einer chemischen Spaltung mit NTCB und Hydroxylamin legten nahe, dass nur das Zink-Finger-Motiv eine Quervernetzung mit dem untersuchten ARS1-Fragment eingeht. Die vollständige Spaltung des Quervernetzungsproduktes mit Trypsin und PDE I/II lieferte ein Peptid-Nukleotid-Addukt, das mittels MALDI-MS charakterisiert wurde. Es gelang, das Peptid NSHR aus der Zink-Finger-Region zu identifizieren, das höchstwahrscheinlich über His57 einen spezifischen DNA-Kontakt mit dem IdU-Rest an Position 8 im ARS1-Oligonukleotid bildet. Damit ist die Beteiligung des Zn-Fingers des ABF1-Proteins an der DNA-Bindung eindeutig nachgewiesen.

7. Summary

The ABF1-Protein from *S. cerevisiae* is known as a multifunctional transcription factor that binds to dsDNA. It is responsible not only for transcription processes in the cell but also plays a role in DNA-replication and in nucleosome remodelling or structure change of the chromatin. The protein was identified in quite a few different experiments which is a strong indication for a key function in the basic cell processes.

For this reason, the central ABF1 function, i.e. the recognition and binding process to the corresponding DNA element, has been studied *in vitro* within the presented work. The experiments base on the literature on the specific recognition motive 5'-CGTNNNNRRYGAY (conserved nucleotides are underlined) and the structural domains of ABF1: zinc finger motive, helix turn helix motive (HTH) and C-terminated transactivation domains.

Gelshift experiments with different DNA-probes revealed that ABF1 shows orientation dependent binding and that it has a tendency to oligomerization. The binding affinity strongly depends on the probe length – upon shortening the DNA fragment from 27 to 20 bp the binding constant changes by an order of magnitude – whereas variation of the base pairs in the unconserved part of the consensus motive shows no remarkable effect on the binding affinity. Together with the experiments of mismatched ARS1 fragments we can conclude that there are only very few contact points between ABF1 and the unconserved part of the DNA recognition motive. With the *in vitro* DNA selection method SELEX we could more specifically describe the ABF1-recognition motive. Two dsDNA-aptameres making the major fraction in the DNA pool after purification were shown to enhance the DNA binding affinity by a factor of 20 with respect to an ARS1 fragment.

Most of the identified ABF1 recognition motives could be found in the genome of *S. cerevisiae*. A sequence analysis of the extracted aptameres led us to postulate a larger consensus motive: 5'-TACCGTATNNNATGATGT. The thermodynamic properties and the kinetics of the ABF1-DNA binding process were investigated by surface plasmon resonance spectroscopy. From the reaction and equilibrium constants in the observed temperature (10–35 °C) and salt concentration range (100–300 mM NaCl) we could estimate a number of 6 to 7 ionic contacts for the specific ABF1-ARS1 interaction. The dissociation reaction was found to strongly depend on the ion concentration. The association reaction constant k_A showed only a weak dependency on the external conditions but was – in contrast to k_D – highly sequence-specific.

The temperature dependence of the thermodynamic reaction parameters reveals that for physiological temperatures, the binding between ABF1 and DNA is an enthalpy controlled process.

Finally, by UV-induced cross-linking of a 27 bp long, I⁵dU-substituted ARS1 fragment with ABF1, we investigated the DNA binding domain and the contacting amino acids. The zinc finger and the HTH motive were known as possible candidates. The limited proteolysis of the cross-linked complex by trypsin and the results from a chemical cleavage reaction with NTCB and hydroxylamine indicated that only the zinc finger motive cross-links with the investigated ARS1 fragment. The complete cleavage of the cross-linked complex by trypsin and PDE I/II led to a nucleo-peptide adduct that was then further characterized by MALDI-MS. We could identify the NSHR peptide from the zinc finger region that probably builds a specific DNA contact to the IdU group at position 8 of the ARS1 oligonucleotide with its His57. With this, we proved that the zinc finger plays a key role in the DNA specific binding of the ABF1 protein.

8. Anhang

8.1. Vergleich der selektierten Sequenzen mit genomischer *S. cerevisiae* DNA

Tabelle 8-1 Vorkommen der selektierten Sequenzen aus dem 15-I-Pool mit der genomischen *S. cerevisiae* DNA. utr5_sc_2000 – nicht translatierte, 2000 bp vom ORF entfernte 5'-Region; bei den Sequenzabweichungen sind die vorgenommenen Änderungen in der Tabelle einzeln aufgelistet.

Chromosom	Quelle	Locus-Name	Locus- / Gen-Information
Selex_8rev TCATGTTATACG			
X	utr5_sc 2000	SCXCOSM83	ORF YJR83.7
X	utr5_sc 2000	SCYJR005W	APL1-Gen: β -Adaptin, große Untereinheit des Clathrin-assoziierten Protein- (AP) -Komplexes
X	utr5_sc 2000	YJR006W/ HYS2	HYS2: DNA Polymerase δ 55 kDa Untereinheit
Selex_4 CGTGGCGAATGA – keine Homologie			
Analyse ATGTTCTGGCGAATGA – mit 2 Änderungen			
IV	utr5_sc 2000	YDR027C/ LUV	An der Vacuole-Biogenese beteiligtes Protein (ATGTTCTGGGGTAATGA)
IV	ORF	SC354CHIV	HEX2 (SRN1, REG1) Glukose-Repressor (TCATTACC-CACGAACAT)
IV	ORF	SCYDR027C	ORF YDR027c
Selex_86 CGTATTTGGTGA			
XIII	utr5_sc 2000	YML029W	Hypothetischer ORF pre-mRNA Splicing Factor USA1
XIII	ORF	SC8337	Hypothetischer ORF Mitochondriales, ribosomales Protein MRPL39 (YmL39)
Selex_15 CGTGTCTCGTGA			
XIII	ORF	YMR049C/ ERB1	An Ribosomen-Biogenese beteiligtes konserviertes Eukaryonten Protein
Selex_23 CGTATTGATTGAT			
IV	utr5_sc 2000	YDL135C/ RDI1	Rho-GDP Dissoziationsinhibitor
V	utr5_sc 2000	YER014C-A/BUD25	<i>bud site selection</i>
V	ORF	YER015W/ FAA2	Acyl-CoA Synthetase (Fettsäure CoA Ligase) (Fettsäure-Aktivator 2)
XVI	utr5_sc 2000	YPR098C	Hypothetisches ORF
XVI	utr5_sc 2000	YPR100W	Hypothetischer ORF

Chromosom	Quelle	Locus-Name	Locus- / Gen-Information
XVI	utr5_sc 2000	YPR101W/ SNT309	Komponente des mit Splicingfactor Prp19p assoziierten Proteinkomplexes
Selex_2rev CGTGATGTATGAT			
VII	utr5_sc 2000	YGR013W/ SNU71	Mit U1-snRNP assoziiertes Protein
VII	ORF	SCYGR012W	Hypothetischer ORF
Selex_76 CGTAGTGCAGTGA – keine Homologie			
Analyse CGTAG-GCAGTGA			
XV	ORF	SCFAA1	Fettsäure Acyl-CoA Synthetase (FAA1)
Selex_210 CGTAGGGGATCGT – keine Homologie			
Selex_210 CGTTAGTTACGTA – keine Homologie			
Selex_210 CGTATGCAAGCTT – keine Homologie			

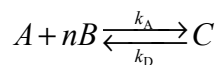
Tabelle 8-2 Vorkommen der selektierten Sequenzen aus dem 15-II-Pool in der genomischen *S. cerevisiae* DNA. utr5_sc_2000 – nicht translatierte, 2000 bp vom ORF entfernte 5'-Region; bei den Sequenzabweichungen sind die Änderungen in der Tabelle einzeln aufgelistet.

Chromosom	Quelle	Bezeichnung	Locus- / Gen-Information
Selex_130 CGTGGAAGATGA			
IV	ORF	YDL216C/ RRI1	Hypothetischer ORF
X	ORF	YJL062W-A	Hypothetischer ORF
XII	ORF	YLR237W/ THI7	Thiamin Transporterprotein
IV	utr5_sc 2000	YDL217C/ TIM22	Importin der inneren mitochondrialen Membran
X	utr5_sc 2000	YJL066C/ MPM1	Hypothetischer ORF
X	utr5_sc 2000	YJL062W/ LAS21	Membranprotein
X	utr5_sc 2000	YJL065C	Hypothetischer ORF
X	utr5_sc 2000	YJL063C/MRPL8	Mitochondriales ribosomales Protein MRPL8 (YmL8)
XII	utr5_sc 2000	YLR235C	Hypothetischer ORF
XII	utr5_sc 2000	YLR236C	Hypothetischer ORF
XII	utr5_sc 2000	YLR238W	Hypothetischer ORF
Selex_54 CGTATGGTGTGA			
XVI	ORF	YPR180W/ AOS1	Dem Ubiquitinaktivator homologes Protein
XVI	utr5_sc 2000	YPR179C/ PLO1	Hypothetischer ORF
Selex_17 TCGTTTTGTACGT			
XV	utr5_sc 2000	YOR063W/ RPL3	Ribosomales Protein L3 (rp1) (YL1)
XV	utr5_sc 2000	YOR062C	Hypothetischer ORF
Selex_141-1 CGTGTATTGTTA			
Selex_141-2 ATTGTTACCACG			

Chromosom	Quelle	Bezeichnung	Locus- / Gen-Information
XI	ORF	YKL139W/ CTK1	α Untereinheit der Kinase (Phosphorylierung der grossen Untereinheit CTD der RNA-Polymerase)
XII	ORF	YLR087C/ CSF1	Hypothetischer ORF
IX	utr5_sc 2000	YIL070C/ MAM33	Protein der Atmungskette in Mitochondrien
IX	utr5_sc 2000	YIL069C/ RPS24B	40S ribosomales Protein S24B
Selex_133 ACGTCGGTAGTGA			
VII	utr5_sc 2000	YGL234W/ADE5,7	Glycinamid- und Aminoimidazole Ribotide Synthetasen
VII	utr5_sc 2000	YGL236C/ MTO1	Optimierung der Translation in Mitochondrien
Selex_14 CGTTCGTAGTAT			
XVI	ORF	YPL072W/ UBP16	Ubiquitin-Spaltungsenzym
XVI	utr5_sc 2000	YPL070W	Hypothetischer ORF
XVI	utr5_sc 2000	YPL073C	Hypothetischer ORF

8.2. Berechnung der Gleichgewichtskonstanten

Für die Reaktion



gilt für die Gleichgewichtskonstanten K_D bzw. K_A unter Annahme kooperativer Bindung:

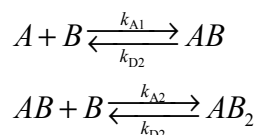
$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_D}{k_A} = \frac{[A]_{\text{eq}} \cdot [B]_{\text{eq}}^n}{[C]_{\text{eq}}}$$

Während der Gelretardationsexperimente gilt $[B]_{\text{eq}} = [B]_0$, weil $[A]_0 \ll [B]_0$. Experimentell wird die Gleichgewichtskonzentration $[C]_{\text{eq}}$ in Abhängigkeit von der Ausgangsproteinkonzentration $[B]_0$ bestimmt. Die Hill-Gleichung kann umgeschrieben werden:

$$[C]_{\text{eq}} = \frac{[A]_0 \cdot [B]_0^n}{[B]_0^n + K_D} \quad \text{Gl. 4-1}$$

Hier bezeichnet n den Hill-Koeffizient, K_D ist die Hill-Konstante. Für $n=1$ wird Gl. 4-1 zur sog. Michaelis-Menten-Gleichung.

Während der Gelretardationsexperimente mit ABF1 (B) konnte nicht ausgeschlossen sein, dass das ABF1-Protein Dimere auf der DNA (A) bildet:



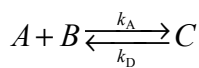
Es wurde angenommen, dass die DNA-ABF1 und ABF1-ABF1-Bindungsstellen von einander unabhängig sind. Folgende Auswertung wurde mittels „Mathematica“-Software (H. Hänsel) durchgeführt. Ohne Berücksichtigung des Verbrauchs an B wurde nach Auflösung der Gleichung erhalten:

$$\frac{[AB_2] + [AB]}{[A]_0} = \frac{\frac{[B]_0^2 \cdot [AB_2]}{K_{D1} \cdot K_{D2}} + \frac{[B]_0 \cdot [AB]}{K_{D1}} + [A]_0}{[A]_0 \cdot \left(1 + \frac{[B]_0}{K_{D1}} + \frac{[B]_0^2}{K_{D1} \cdot K_{D2}} \right)} \quad \text{Gl. 8-1}$$

8.3. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten

8.3.1. Assoziationskinetik

Für die ABF1-DNA-Bindungsreaktion wurde eine 1:1 Kinetik vorausgesetzt:



Für die zeitliche Änderung von $[C]$ gilt:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_A \cdot [A] \cdot [B] - k_D \cdot [C]$$

Bei den SPR-Messungen ist ein Reaktand (B) fest am Sensor-Chip gebunden. Die Anzahl freier Reaktanden auf der Oberfläche des Chips lässt sich mit Hilfe der *Response Units* (RU) des Gerätes auszudrücken:

$$B = RU_{\max} - RU$$

Dabei ist RU_{\max} die maximal mögliche Bedeckung, RU ist die bedeckte Chipoberfläche. Der Analyt (A) wird während der Injektionsphase ständig durch die Messzelle gepumpt und annähernd gilt dann: $[A] \approx [A]_0$. Das Geschwindigkeitsgesetz pseudo 1. Ordnung kann damit umgeschrieben werden zu:

$$\frac{dRU}{dt} = k_A \cdot [A]_0 (RU_{\max} - RU) - k_D \cdot RU \quad \text{und}$$

$$\frac{dRU}{dt} = k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max} - (k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot RU \quad \text{Gl. 8-2}$$

Theoretisch ist die dRU/dt vs. RU Grafik linear mit einer Steigung $-s = k_A \cdot [A]_0 + k_D$.

Aus der Steigung der linearen Grafik $-s$ vs. $[A]_0$ erhält man die k_A -Werte und aus dem Achsenabschnitt $-k_D$. In der Praxis gilt die Gleichung nicht mehr, wenn $k_A \cdot C \gg k_D$. Nach dem

Integrieren und Lösen der inhomogenen Differenzialgleichung erhält man aus Gl. 8-2 eine Gleichung für die nicht-lineare Regressionsanalyse der SPR-Sensogramme, die in der Regel für die Auswertung der Messdaten von ABF1-DNA-Assoziationsreaktionen benutzt wurde:

$$RU(t) = \frac{k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max}}{k_A \cdot [A]_0 + k_D} \cdot (1 - e^{-(k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot t}) \quad \text{Gl. 8-3}$$

wobei $RU_{\text{eq}} = \frac{k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max}}{k_A \cdot [A]_0 + k_D}$. Hier ist RU_{eq} die Bedeckung des Chips in dem Gleichgewichtszustand. Setzt man diese Lösung (Gl. 8-3) in die Gl. 8-2, erhält man:

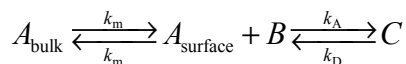
$$\frac{dRU}{dt} = k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max} \cdot e^{-(k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot t}$$

Logarithmieren führt zu folgender Gleichung:

$$\ln \frac{dRU}{dt} = \ln(k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max}) \cdot -(k_A \cdot [A]_0 + k_D) \cdot t \quad \text{Gl. 8-4}$$

Der Plot der Grafik $\ln \frac{dRU}{dt}$ vs. t ist linear mit der Steigung $m = -k_A \cdot [A]_0 + k_D$ und dem Achsenabschnitt $n = \ln(k_A \cdot [A]_0 \cdot RU_{\max})$.

Für eine diffusionskontrollierte Reaktion („*Mass Transport Effect*“) gilt



wobei k_m ein Mass Transfer-Koeffizient ist. Er setzt sich zusammen aus dem Diffusionskoeffizienten des Analyten D_A , den Dimensionen der Messzelle (b , l , h) und der Flussrate f :

$$k_m = 0,98 \cdot \left(\frac{D_A}{h} \right)^{\frac{2}{3}} \cdot \left(\frac{f}{0,3 \cdot b \cdot l} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Die effektiven Geschwindigkeitskonstanten k_f (*forward*) und k_r (*reverse*) werden folgendermaßen definiert:

$$k_f = \frac{k_A \cdot k_m}{k_A \cdot [B] + k_m} \quad \text{und} \quad k_r = \frac{k_D \cdot k_m}{k_A \cdot [B] + k_m}$$

Nach dem Umschreiben des Geschwindigkeitsgesetzes:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_f \cdot [A_{\text{bulk}}] \cdot [B] - k_r \cdot [AB] \quad \text{Gl. 8-5}$$

für komplett diffusionskontrollierte Reaktionen ($k_A \cdot [B] \gg k_m$) erhält man

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_m \cdot [A] - \frac{k_D \cdot k_m}{k_A \cdot [B]} \cdot [AB] \quad \text{und}$$

$$\frac{d[RU]}{dt} = k_m \cdot [A]_0 - \frac{k_D \cdot k_m}{k_A \cdot (RU_{\max} - RU)} \cdot RU \quad \text{Gl. 8-6}$$

8.3.2. Dissoziationskinetik

Die Dissoziationsphase kann, falls keine re-Assoziationsreaktion stattfindet, mit einer Reaktionskinetik 0. Ordnung beschrieben werden:

$$\frac{dRU}{dt} = -k_D \cdot RU$$

Nach der Trennung der Variablen und Integration von t_0 bis t ergibt sich eine exponentielle Gleichung:

$$RU_t = RU_0 \cdot e^{-k_D \cdot (t-t_0)} \quad \text{Gl. 8-7}$$

Logarithmieren führt zu

$$\ln \frac{RU_0}{RU_t} = k_D \cdot (t-t_0) \quad \text{Gl. 8-8}$$

bzw. zu

$$\ln \frac{dRU}{dt} = \ln(-k_D \cdot RU_0) - k_D \cdot (t-t_0) \quad \text{Gl. 8-9}$$

Aus der Steigung des linearen Plots $\ln \frac{RU_0}{RU_t}$ bzw. $\ln \frac{dRU}{dt}$ vs. $(t-t_0)$ berechnet sich k_D . Die

Dissoziation des ABF1-DNA-Komplexes verlief in zwei parallel ablaufenden Zerfallsreaktionen, die mit folgender Gleichung beschrieben wurden:

$$RU_t = RU_{01} \cdot e^{-k_{D1} \cdot (t-t_0)} + RU_{02} \cdot e^{-k_{D2} \cdot (t-t_0)} \quad \text{Gl. 8-10}$$

Neben der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{D1} und k_{D2} wurden deren Amplituden RU_{01} und RU_{02} , sowie der prozentuale Anteil der jeweiligen Amplitude in der Gesamtamplitude bestimmt.

Für die Dissoziationsreaktion mit driftender Basislinie (falls der nicht-kovalent gebundene Ligand von der Oberfläche dissoziiert) gilt

$$RU_t = RU_0 \cdot e^{-k_D \cdot (t-t_0)} + RU_{\text{drift}} \cdot (t-t_0) \quad \text{Gl. 8-11}$$

8.3.3. Berechnung der Standardabweichung

Die K_D - bzw. K_A -Werte der Bindungsreaktion wurden nach der SPR-Messung aus den bestimmten k_A und k_D -Werten berechnet. Die Standardabweichung der K_D -Werte (ΔK_D) wurde nach der Lösung der Differenzialgleichung in folgenden Schritten abgeleitet. Für K_D als Funktion von k_A und k_D gilt

$$K(x, y) = \frac{x}{y} = \frac{k_D}{k_A} \quad \text{und} \quad \Delta K = \pm \sqrt{\left(\frac{\partial K}{\partial x}\right)^2 \cdot \Delta x^2 + \left(\frac{\partial K}{\partial y}\right)^2 \cdot \Delta y^2} \quad \text{Gl. 8-12}$$

Mit Δ wird hier die Standardabweichung der Konstanten bezeichnet. Nach der Lösung der Differenzialgleichung gilt

$$\Delta K = \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{y}\right)^2 + \left(-\frac{x \cdot \Delta y}{y^2}\right)^2} \quad \text{und}$$

$$\Delta K_D = \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta k_D}{k_A}\right)^2 + \left(-\frac{k_D \cdot \Delta k_A}{k_A^2}\right)^2} \quad \text{Gl. 8-13}$$

Analog für ΔK_A :

$$\Delta K_A = \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta k_A}{k_D}\right)^2 + \left(-\frac{k_A \cdot \Delta k_D}{k_D^2}\right)^2} \quad \text{Gl. 8-14}$$

Für die logarithmische Auftragung der $\log K_A$ vs. $1/T$ gilt

$$\log K_A \pm \frac{\partial(\log K_A)}{\partial K_A} \cdot \Delta K_A$$

Die Lösung der Differenzialgleichung führt zu

$$\log K_A \pm \frac{1}{K_A \cdot \log 10} \cdot \Delta K_A \quad \text{Gl. 8-15}$$

Die Standardabweichung der ΔG und ΔS wurde ebenfalls nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz, analog der Gl. 8-12 berechnet:

$$\Delta(\Delta G) = \pm \frac{\partial(\Delta G)}{\partial K_A} \cdot \Delta K_A = \pm \frac{\partial(-RT \cdot \ln K_A)}{\partial K_A} \cdot \Delta K_A$$

$$\Delta(\Delta G) = \pm \frac{(-RT)}{K_A} \cdot \Delta K_A \quad \text{Gl. 8-16}$$

$$\Delta(\Delta S) = \pm \sqrt{\left(\frac{\partial(\Delta S)}{\partial(\Delta H)}\right)^2 \cdot \Delta(\Delta H)^2 + \left(\frac{\partial(\Delta S)}{\partial(\Delta G)}\right)^2 \cdot \Delta(\Delta G)^2}$$

$$\Delta(\Delta S) = \pm \sqrt{\left(\frac{1}{T}\right)^2 \cdot \Delta(\Delta H)^2 + \left(\frac{-1}{T}\right)^2 \cdot \Delta(\Delta G)^2}$$

Gl. 8-17

8.4. Zusammenfassung der ABF1-DNA-Bindungskonstanten nach SPR-Messung

Die Bindungskonstanten wurden wie folgt berechnet. Die Dissoziationsphase wurde nach dem Modell „Dissoziation k_{D1} & k_{D2} “ („Zwei Dissoziationsreaktionen“ Gl. 8-10) ausgewertet. In den meisten Fällen betrug der k_{D1} -Anteil etwa 10–20 % in der gesamten Dissoziationsreaktion im Temperaturbereich von 10°C bis 30°C. Zwischen 100 und 400 mM NaCl wurde ein fast linearer Anstieg des k_{D1} -Einflusses beobachtet (Abb. 8-1).

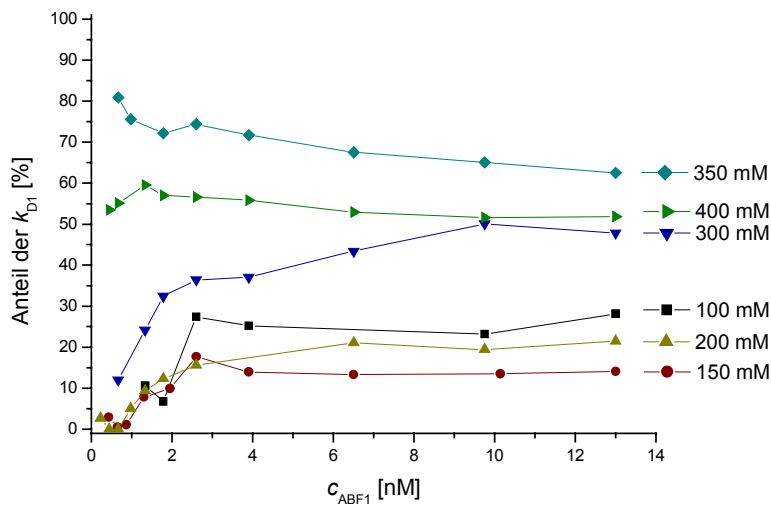


Abb. 8-1 Grafische Darstellung des Anteils von k_{D1} in der ABF1-DNA-Dissoziation bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

Der erste Dissoziationsprozess wurde nach ca. 200 s abgeschlossen. Die zweite Phase beschreibt die Dissoziationsreaktion nach der spezifischen ABF1-DNA-Bindung. Aus diesem Grund wurde nur die zweite k_D in die weitere Auswertung einbezogen. Die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgte nach dem Modell „1:1 Langmuir Assoziation“ (Gl. 8-3), wobei die k_D -Werte in die Berechnung als konstante Werte einbezogen wurden. Die Abweichung der Geschwindigkeitskonstanten wurde aus der Biacore-Auswertung übernommen, ΔK_D wurde nach der Gl. 8-13 berechnet.

Tabelle 8-3 Für die ABF1-DNA-Bindung mittels SPR-Messung bestimmte Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten. Geschwindigkeitskonstanten wurden nach der Gl. 8-3 und Gl. 8-10 berechnet. Die Standardabweichung, die höher als 10^{-5} ist, wurde nicht dargestellt.

150 mM NaCl, 20 μ l/min				
Bedingungen	k_A [$\cdot 10^6$ M $^{-1}$ ·s $^{-1}$]	k_{D1} & k_{D2} [$\cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$]	K_D [$\cdot 10^{-9}$ M]	χ^2
ARS 121-1, 16°C, 70 RU	1,02 \pm 0,005	0,334 \pm 0,0002	0,0328 \pm 0,0002	1,96
ARS120, 18°C, 33 RU	2,49 \pm 0,0	0,317 \pm 0,0002	0,0127 \pm 0,000009	3,18

ARS1, 130 RU, 16°C, 10 μ l/min				
Bedingungen	k_A [$\cdot 10^6$ M $^{-1}$ s $^{-1}$]	k_{D1} & k_{D2} [$\cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$]	K_D [$\cdot 10^{-9}$ M]	χ^2
200 mM NaCl	2,91 \pm 0,0	1,34 \pm 0,0007	0,0461 \pm 0,00002	0,94
200 mM NaCl 10 mM MgCl $_2$	2,78 \pm 0,0	6,16 \pm 0,0055	0,222 \pm 0,0002	0,873
350 mM NaCl	3,25 \pm 0,031	1,80 \pm 0,0018	0,0554 \pm 0,00053	1,11
350 mM NaCl 60 μ l/min	3,35 \pm 5,48·10 $^{-2}$	2,94 \pm 0,037	0,0879 \pm 0,0018	0,765

ARS1, 130 RU, 16°C, 10 μ l/min				
c_{NaCl} [mM]	k_A [$\cdot 10^6$ M $^{-1}$ ·s $^{-1}$]	k_{D1} & k_{D2} [$\cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$]	K_D [$\cdot 10^{-9}$ M]	χ^2
100	2,50 \pm 0,0	0,0161 \pm 0,0023	(6,43 \pm 0,93)·10 $^{-4}$	2,83
150	2,28 \pm 0,0	0,201 \pm 0,0	0,0088 \pm 0,0	2,4
200	2,91 \pm 0,0	1,34 \pm 0,00068	0,0461 \pm 0,000023	0,94
300	2,63 \pm 0,0013	8,79 \pm 0,025	0,334 \pm 0,00095	0,495
350	3,25 \pm 0,031	1,80 \pm 0,0018	0,0554 \pm 0,00053	1,11
400	1,90 \pm 0,001	1,35 \pm 0,03	0,0712 \pm 0,0016	1,24
500	0,34 \pm 0,00028	6,04 \pm 0,00055	1,78 \pm 0,0015	0,416

ARS1, 130 RU, 200mM NaCl, 10 μ l/min				
T [°C]	k_A [$\cdot 10^6$ M $^{-1}$ ·s $^{-1}$]	k_{D1} & k_{D2} [$\cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$]	K_D [$\cdot 10^{-9}$ M]	χ^2
10	2,82 \pm 0,0	1,12 \pm 0,036	0,0396 \pm 0,0013	1,37
16	2,91 \pm 0,0	1,34 \pm 0,00068	0,0461 \pm 0,00002	0,94
20	3,11 \pm 0,0	1,87 \pm 0,022	0,0602 \pm 0,0007	1,0
25	3,30 \pm 0,0	2,68 \pm 0,0	0,0813 \pm 0,0	1,33
30	4,37 \pm 0,0	9,19 \pm 0,0325	0,21 \pm 0,00075	0,892
35	3,08 \pm 0,043	19 \pm 0,303	0,391 \pm 0,013	0,391

8.5. Mittels MALDI-MS identifizierte ABF1-Peptide

Tabelle 8-4 Identifizierte tryptische Peptide nach dem Verdau des ABF1's und des Quervernetzungsproduktes. Das Quervernetzungsprodukt wurde vor und nach der Behandlung mit Phosphodiesterase (PDE I und II) analysiert. Die verwendete Massentoleranz betrug ± 1 Da. Autokatalytische Trypsinfragmente sind dargestellt. Die Position der Peptide wurde unter Berücksichtigung der während der Klonierung des *abf1*-Gens eingebauten zwei Aminosäuren gerechnet. Die negativ geladene Aminosäuren Asp und Glu sind rot dargestellt.

ABF1 + Trypsin				
m/z	Abweichung	Peptid	Position	Fehlende Spaltungsstellen
659.590	-0.206	Trypsin	64-69	0
1020.490	+0.012	Trypsin	160-169	0
2162.900	+0.156	Trypsin	70-89	0
2273.000	+0.159	Trypsin	90-109	0
990.300	-0.638	ARFVLKKK	429-436	3
1191.510	-0.900	LVVNY E YK	6-14	0
1191.510	+0.138	LPHEVA E QLR	644-653	0
1253.490	+0.158	QHLDIT L EER	629-638	0
1340.550	-0.740	ITTYKARFVLK	424-434	2
1692.490	+0.277	N D EDDSINKASID R	189-203	1
1692.490	+0.323	HFTFACHLKNCPFK	63-76	1
1792.740	+0.142	N E DDKLPHEVA E QLR	639-653	1
1864.670	+0.110	GL D DESGPTHGND S GNH	204-221	0
1987.780	+0.092	A D DEEDLS D ENIQP E LR	714-730	0
2192.850	+0.320	G D KLVVNY E YKHPIINK	3-20	2
2824.080	+0.209	NTTHHNNHHSQP H DEEDVAGLIGK	689-713	0
3141.070	+0.270	MGE Y N D LQPSSSSNNNNN N DG E LSGTNLR	438-466	0

Quervernetzungsprodukt + Trypsin				
m/z	Abweichung	Peptid	Position	Fehlende Spaltungsstellen
2163.120	-0.063	Trypsin	70-89	0
1192.000	-0.351	LPHEVA E QLR	644-653	0
1340.740	-0.930	ITTYKARFVLK	424-434	2
1583.750	-0.074	HNE E DDVHTQMTK	222-234	0
1778.360	-0.465	MRG D KLVVNY E YK	1-14	2

1792.900	-0.017	NEDDKLPHEVAEQLR	639-653	1
1864.840	-0.059	GLDDESGPTHGNDSGNHR	204-221	0
1948.880	+0.096	IEPYHSHPLEDNLSLGK	336-352	0
1988.030	-0.157	ADDEEDLSDENIQPELR	714-730	0
1988.030	+0.980	VSHYVEESGLLDILMQR	388-404	0
2057.970	-0.062	NVVDENLINDMSEDAHK	608-625	0
3140.990	+0.350	MGEYNDLQPSSSSNNNNNDGELSGTNLR	438-466	0

Quervernetzungsprodukt + Trypsin + PDE I/II				
m/z	Abweichung	Peptid	Position	Fehlende Spaltungsstellen
1432.730	+0.990	Trypsin	207-220	0
1776.990	+0.904	MRGDKLVVNYEYK	1-14	2
1792.900	-0.017	NEDDKLPHEVAEQLR	639-653	1
1948.930	+0.046	IEPYHSHPLEDNLSLGK	336-352	0
1987.880	-0.007	ADDEEDLSDENIQPELR	714-730	0
3141.010	+0.330	MGEYNDLQPSSSSNNNNNDGELSGTNLR	438-466	0

9. Literaturverzeichnis

- Adams, R. L.** (1990). DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem.J.* **265**, 309-320.
- Allen, T. D., Wick, K. L. & Matthews, K. S.** (1991). Identification of amino acids in lac repressor protein cross-linked to operator DNA specifically substituted with bromodeoxyuridine. *J.Biol.Chem.* **266**, 6113-6119.
- Angelov, D., Stefanovsky, V. Y., Dimitrov, S. I., Russanova, V. R., Keskinova, E. & Pashev, I. G.** (1988). Protein-DNA crosslinking in reconstituted nucleohistone, nuclei and whole cells by picosecond UV laser irradiation. *Nucleic.Acids.Res.* **16**, 4525-4538.
- Angermayr, M. & Bandlow, W.** (1997). The general regulatory factor Reb1p controls basal, but not Gal4p-mediated, transcription of the GCY1 gene in yeast. *Mol.Gen.Genet.* **256**, 682-689.
- Ansorge, W.** (1985). Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J.Biochem.Biophys.Methods* **11**, 13-20.
- Asensio, J. L., Dosanjh, H. S., Jenkins, T. C. & Lane, A. N.** (1998). Thermodynamic, kinetic, and conformational properties of a parallel intermolecular DNA triplex containing 5' and 3' junctions. *Biochemistry* **37**, 15188-15198.
- Bell, S. P. & Stillman, B.** (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**, 128-134.
- Berg, J. M.** (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J.Biol.Chem.* **265**, 6513-6516.
- BIATEchnology Handbook (1994). Pharmacia Biosensor AB.
- Biswas, S. B. & Biswas, E. E.** (1990). ARS binding factor I of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* binds to sequences in telomeric and nontelomeric autonomously replicating sequences. *Mol.Cell Biol.* **10**, 810-815.
- Bondeson, K., Frostell-Karlsson, A., Fagerstam, L. & Magnusson, G.** (1993). Lactose repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal.Biochem.* **214**, 245-251.
- Bornstein, P. & Balian, G.** (1977). Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. *Methods Enzymol.* **47:132-45.**, 132-145.
- Breaker, R. R.** (1997). DNA aptamers and DNA enzymes. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **1**, 26-31.
- Brewer, B. J. & Fangman, W. L.** (1994). Initiation preference at a yeast origin of replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 3418-3422.
- Buchman, A. R. & Kornberg, R. D.** (1990). A yeast ARS-binding protein activates transcription synergistically in combination with other weak activating factors. *Mol.Cell Biol.* **10**, 887-897.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Charlton, J. & Smith, D.** (1999). Estimation of SELEX pool size by measurement of DNA renaturation rates. *RNA.* **5**, 1326-1332.

- Cho, G., Kim, J., Rho, H. M. & Jung, G.** (1995). Structure-function analysis of the DNA binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* ABF1. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2980-2987.
- Clyne, R. K. & Kelly, T. J.** (1997). Identification of autonomously replicating sequence (ARS) elements in eukaryotic cells. *Methods* **13**, 221-233.
- Cooper, T. A.** (1999). In vivo SELEX in vertebrate cells. *Methods Mol. Biol.* **118**, 405-417.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G. D. & Calvo, J. M.** (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol.* **177**, 4872-4880.
- Daniel, R., Caminade, E., Martel, A., Le, G. F., Canosa, D., Carrascal, M. & Abian, J.** (1997). Mass spectrometric determination of the cleavage sites in *Escherichia coli* dihydroorotase induced by a cysteine-specific reagent. *J. Biol. Chem.* **272**, 26934-26939.
- Dank, N.** (1997). Ortsspezifische Photoquervernetzung von Protein-DNA-Komplexen unter Anwendung von 5-Iod-2'-desoxyuridin als Chromophor. Dissertation, Bayreuth.
- De Winde, J. H., Van Leeuwen, H. C. & Grivell, L. A.** (1993). The multifunctional regulatory proteins ABF1 and CPF1 are involved in the formation of a nuclease-hypersensitive region in the promoter of the QCR8 gene. *Yeast.* **9**, 847-857.
- Della Seta, F., Ciafre, S. A., Marck, C., Santoro, B., Presutti, C., Sentenac, A. & Bozzoni, I.** (1990a). The ABF1 factor is the transcriptional activator of the L2 ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2437-2441.
- Della Seta, F., Treich, I., Buhler, J. M. & Sentenac, A.** (1990b). ABF1 binding sites in yeast RNA polymerase genes. *J. Biol. Chem.* **265**, 15168-15175.
- Diffley, J. F. & Cocker, J. H.** (1992). Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature* **357**, 169-172.
- Diffley, J. F. & Stillman, B.** (1988). Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2120-2124.
- Diffley, J. F. & Stillman, B.** (1989). Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1. *Science* **246**, 1034-1038.
- Diffley, J. F.** (1992). Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* **62**, 25-33.
- Dorsman, J. C., Gozdicka Jozefiak, A., van Heeswijk, W. C. & Grivell, L. A.** (1991). Multi-functional DNA proteins in yeast: the factors GFI and GFII are identical to the ARS-binding factor ABF1 and the centromere-binding factor CPF1 respectively. *Yeast.* **7**, 401-412.
- Drewell, R. A., Goddard, C. J., Thomas, J. O. & Surani, M. A.** (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1139-1144.
- Edwards, P. R., Lowe, P. A. & Leatherbarrow, R. J.** (1997). Ligand loading at the surface of an optical biosensor and its effect upon the kinetics of protein-protein interactions. *J. Mol. Recognit.* **10**, 128-134.
- Eisenberg, S., Civalier, C. & Tye, B. K.** (1988). Specific interaction between a *Saccharomyces cerevisiae* protein and a DNA element associated with certain autonomously replicating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 743-746.
- El Osta, A., Kantharidis, P., Zalcborg, J. R. & Wolffe, A. P.** (2002). Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1844-1857.

- Emmerich, R., Strehler, P., Hennecke, H. & Fischer, H. M.** (2000). An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4166-4171.
- Enomoto, S., Longtine, M. S. & Berman, J.** (1994). Enhancement of telomere-plasmid segregation by the X-telomere associated sequence in *Saccharomyces cerevisiae* involves SIR2, SIR3, SIR4 and ABF1. *Genetics* **136**, 757-767.
- Escott, G. M., Hearn, V. M. & Adams, D. J.** (1998). Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **144**, 1575-1581.
- Favre, A., Saintome, C., Fourrey, J. L., Clivio, P. & Laugaa, P.** (1998). Thionucleobases as intrinsic photoaffinity probes of nucleic acid structure and nucleic acid-protein interactions. *J.Photochem.Photobiol.B* **42**, 109-124.
- Fox, C. A., Loo, S., Rivier, D. H., Foss, M. A. & Rine, J.** (1993). A transcriptional silencer as a specialized origin of replication that establishes functional domains of chromatin. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **58:443-55.**, 443-455.
- Francesconi, S. C. & Eisenberg, S.** (1991). The multifunctional protein OBF1 is phosphorylated at serine and threonine residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 4089-4093.
- Frank, M. B.** (1999). Characterization of DNA binding properties and sequence specificity of the human 52 kDa Ro/SS-A (Ro52) zinc finger protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **259**, 665-670.
- Gailus-Durner, V., Xie, J., Chintamaneni, C. & Vershon, A. K.** (1996). Participation of the yeast activator Abf1 in meiosis-specific expression of the HOP1 gene. *Mol.Cell Biol.* **16**, 2777-2786.
- Galio, L., Briquet, S. & Vaquero, C.** (1999). Real-time study of interactions between a composite DNA regulatory region (HIV-1 LTR NRE) and several transcription factors of nuclear extracts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **264**, 6-13.
- Gallert, K. C., Ohanjan, T., Daignan-Fornier, B., Lottspeich, F. & Krauss, G.** (1996). Enzymatic properties and inhibition by single-stranded autonomously replicating sequences of adenylosuccinate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* **239**, 487-493.
- Gartenberg, M. R.** (2000). The Sir proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: mediators of transcriptional silencing and much more. *Curr.Opin.Microbiol.* **3**, 132-137.
- Gaston, K. & Fried, M.** (1995). CpG methylation has differential effects on the binding of YY1 and ETS proteins to the bi-directional promoter of the Surf-1 and Surf-2 genes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 901-909.
- Gilbert, D. E. & Feigon, J.** (1999). Multistranded DNA structures. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**, 305-314.
- Gold, L., Brown, D., He, Y., Shtatland, T., Singer, B. S. & Wu, Y.** (1997). From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: novel biological regulatory loops. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 59-64.
- Golden, M. C., Collins, B. D., Willis, M. C. & Koch, T. H.** (2000). Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. *J Biotechnol.* **81**, 167-178.
- Golden, M. C., Resing, K. A., Collins, B. D., Willis, M. C. & Koch, T. H.** (1999). Mass spectral characterization of a protein-nucleic acid photocrosslink. *Protein Sci.* **8**, 2806-2812.
- Goncalves, P. M., Griffioen, G., Minnee, R., Bosma, M., Kraakman, L. S., Mager, W. H. & Planta, R. J.** (1995). Transcription activation of yeast ribosomal protein genes requires additional elements apart from binding sites for Abf1p or Rap1p. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1475-1480.
- Goncalves, P. M., Maurer, K., Mager, W. H. & Planta, R. J.** (1992). *Kluyveromyces* contains a functional ABF1-homologue. *Nucleic.Acids.Res.* **20**, 2211-2215.

- Goodman, S. D., Velten, N. J., Gao, Q., Robinson, S. & Segall, A. M.** (1999). In vitro selection of integration host factor binding sites. *J Bacteriol.* **181**, 3246-3255.
- Gossen, M., Pak, D. T., Hansen, S. K., Acharya, J. K. & Botchan, M. R.** (1995). A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* **270**, 1674-1677.
- Gottlieb, P. A., Wu, S., Zhang, X., Tecklenburg, M., Kuempel, P. & Hill, T. M.** (1992). Equilibrium, kinetic, and footprinting studies of the Tus-Ter protein-DNA interaction. *J.Biol.Chem.* **267**, 7434-7443.
- Guajardo, R. & Sousa, R.** (1999). Characterization of the effects of *Escherichia coli* replication terminator protein (Tus) on transcription reveals dynamic nature of the tus block to transcription complex progression. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2814-2824.
- Halfter, H., Kavety, B., Vandekerckhove, J., Kiefer, F. & Gallwitz, D.** (1989a). Sequence, expression and mutational analysis of BAF1, a transcriptional activator and ARS1-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **8**, 4265-4272.
- Halfter, H., Muller, U., Winnacker, E. L. & Gallwitz, D.** (1989b). Isolation and DNA-binding characteristics of a protein involved in transcription activation of two divergently transcribed, essential yeast genes. *EMBO J.* **8**, 3029-3037.
- Hall, D.** (2001). Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes. *Anal.Biochem.* **288**, 109-125.
- Hart, D. J., Speight, R. E., Cooper, M. A., Sutherland, J. D. & Blackburn, J. M.** (1999). The salt dependence of DNA recognition by NF-kappaB p50: a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1063-1069.
- Haseley, S. R., Talaga, P., Kamerling, J. P. & Vliegthart, J. F.** (1999). Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Anal.Biochem.* **274**, 203-210.
- Henricksen, L. A., Umbricht, C. B. & Wold, M. S.** (1994). Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jun 10;269(23):16519]. *J.Biol.Chem.* **269**, 11121-11132.
- Herlihy, K.** (2002). From isolation to identification: SPR-MS in proteomics. *BIAjournal* vol 2/Number 1
- Hermann, T. & Patel, D. J.** (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**, 820-825.
- Hermann, T. & Westhof, E.** (1999). Non-Watson-Crick base pairs in RNA-protein recognition. *Chem.Biol.* **6**, R335-R343.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R.** (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Hicke, B. J., Willis, M. C., Koch, T. H. & Cech, T. R.** (1994). Telomeric protein-DNA point contacts identified by photo-cross-linking using 5-bromodeoxyuridine [published erratum appears in *Biochemistry* 1994 Jun 21;33(24):7744]. *Biochemistry* **33**, 3364-3373.
- Hiesinger, M., Wagner, C. & Schuller, H. J.** (1997). The acetyl-CoA synthetase gene ACS2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is coregulated with structural genes of fatty acid biosynthesis by the transcriptional activators Ino2p and Ino4p. *FEBS Lett.* **415**, 16-20.
- Holz, B., Dank, N., Eickhoff, J. E., Lipps, G., Krauss, G. & Weinhold, E.** (1999). Identification of the binding site for the extrahelical target base in N6-adenine DNA methyltransferases by photo-cross-linking with duplex oligodeoxyribonucleotides containing 5-iodouracil at the target position. *J.Biol.Chem.* **274**, 15066-15072.

- Huang, R. Y. & Kowalski, D.** (1993). A DNA unwinding element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome. *EMBO J.* **12**, 4521-4531.
- Huang, R. Y. & Kowalski, D.** (1996). Multiple DNA elements in ARS305 determine replication origin activity in a yeast chromosome. *Nucleic Acids Res.* **24**, 816-823.
- Hung, F., Luo, D., Sauve, D. M., Muller, M. T. & Roberge, M.** (1996). Characterization of topoisomerase II-DNA interaction and identification of a DNA-binding domain by ultraviolet laser crosslinking. *FEBS Lett.* **380**, 127-132.
- Isalan, M. & Choo, Y.** (2000). Engineered zinc finger proteins that respond to DNA modification by HaeIII and HhaI methyltransferase enzymes. *J. Mol. Biol.* **295**, 471-477.
- Jabet, C., Sprague, E. R., VanDemark, A. P. & Wolberger, C.** (2000). Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor Tup1. Proposal for an association model of the repressor complex Tup1 x Ssn6. *J. Biol. Chem.* **275**, 9011-9018.
- Joyce, G. F.** (1998). Nucleic acid enzymes: playing with a fuller deck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5845-5847.
- Jung, S. Y., Yoo, H. Y., Kim, Y. H., Kim, J. & Rho, H. M.** (1995). The glucose-dependent transactivation activity of ABF1 on the expression of the TDH3 gene in yeast. *Curr. Genet.* **27**, 312-317.
- Kamiuchi, T., Abe, E., Imanishi, M., Kaji, T., Nagaoka, M. & Sugiura, Y.** (1998). Artificial nine zinc-finger peptide with 30 base pair binding sites. *Biochemistry* **37**, 13827-13834.
- Kang, J. J., Yokoi, T. J. & Holland, M. J.** (1995). Binding sites for abundant nuclear factors modulate RNA polymerase I-dependent enhancer function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 28723-28732.
- Kay, B. K., Kasanov, J. & Yamabhai, M.** (2001). Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* **24**, 240-246.
- Kearsey, S.** (1984). Structural requirements for the function of a yeast chromosomal replicator. *Cell* **37**, 299-307.
- Khalifa, M. B., Choulier, L., Lortat-Jacob, H., Altschuh, D. & Vernet, T.** (2001). BIACORE data processing: an evaluation of the global fitting procedure. *Anal. Biochem.* **293**, 194-203.
- Klug, S. J. & Famulok, M.** (1994). All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Rep.* **20**, 97-107.
- Kohzaki, H., Ito, Y. & Murakami, Y.** (1999). Context-dependent modulation of replication activity of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7428-7435.
- Kopylov, A. M. & Spiridonova, V. A.** (2000). Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX. *Mol. Biol. (Mosk)* **34**, 1097-1113.
- Kovari, L. Z. & Cooper, T. G.** (1991). Participation of ABF-1 protein in expression of the *Saccharomyces cerevisiae* CAR1 gene. *J. Bacteriol.* **173**, 6332-6338.
- Kraakman, L. S., Griffioen, G., Zerp, S., Groeneveld, P., Thevelein, J. M., Mager, W. H. & Planta, R. J.** (1993). Growth-related expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 196-204.
- Kunzler, M., Springer, C. & Braus, G. H.** (1995). Activation and repression of the yeast ARO3 gene by global transcription factors. *Mol. Microbiol.* **15**, 167-178.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lannutti, B. J., Persinger, J. & Bartholomew, B.** (1996). Probing the protein-DNA contacts of a yeast RNA polymerase III transcription complex in a crude extract: solid phase synthesis of DNA photoaffinity probes containing a novel photoreactive deoxycytidine analog. *Biochemistry* **35**, 9821-9831.
- Lascaris, R. F., Groot, E., Hoen, P. B., Mager, W. H. & Planta, R. J.** (2000). Different roles for abf1p and a T-rich promoter element in nucleosome organization of the yeast RPS28A gene. *Nucleic.Acids.Res.* **28**, 1390-1396.
- Leatherbarrow, R. J. & Edwards, P. R.** (1999). Analysis of molecular recognition using optical biosensors. *Curr.Opin.Chem Biol* **3**, 544-547.
- Lee, D. G. & Bell, S. P.** (1997). Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol.Cell Biol.* **17**, 7159-7168.
- Lee, J. K., Moon, K. Y., Jiang, Y. & Hurwitz, J.** (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 13589-13594.
- Lee, M. Y., Hwang, E. S. & Lee, S. K.** (1998). Novel CRE-binding proteins of 11-16 kDa bind to the LDH A-gene CRE in a sequence specific and hepatocyte-growth dependent manner in partially hepatectomized rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **246**, 50-54.
- Li, R.** (1999). Stimulation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* by a glutamine- and proline-rich transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **274**, 30310-30314.
- Li, R., Yu, D. S., Tanaka, M., Zheng, L., Berger, S. L. & Stillman, B.** (1998). Activation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* by acidic transcriptional activation domains. *Mol.Cell Biol.* **18**, 1296-1302.
- Li, Y. & Breaker, R. R.** (1999). Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**, 315-323.
- Li, Y., Liu, Y. & Breaker, R. R.** (2000). Capping DNA with DNA. *Biochemistry* **39**, 3106-3114.
- Lin, S. & Kowalski, D.** (1997). Functional equivalency and diversity of cis-acting elements among yeast replication origins. *Mol.Cell Biol.* **17**, 5473-5484.
- Lipps, G., Stegert, M. & Krauss, G.** (2001). Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic.Acids.Res.* **29**, 904-913.
- Lipschultz, C. A., Li, Y. & Smith-Gill, S.** (2000). Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance. *Methods* **20**, 310-318.
- Loo, S., Laurenson, P., Foss, M., Dillin, A. & Rine, J.** (1995). Roles of ABF1, NPL3, and YCL54 in silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **141**, 889-902.
- Malmqvist, M. & Karlsson, R.** (1997). Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Curr.Opin.Chem Biol* **1**, 378-383.
- Marahrens, Y. & Stillman, B.** (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* **255**, 817-823.
- Marilley, M.** (2000). Structure-function relationships in replication origins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: higher-order structural organization of DNA in regions flanking the ARS consensus sequence. *Mol.Gen.Genet.* **263**, 854-866.
- Martens, J. A. & Brandl, C. J.** (1994). GCN4p activation of the yeast TRP3 gene is enhanced by ABF1p and uses a suboptimal TATA element. *J.Biol.Chem.* **269**, 15661-15667.

- Martin, J., Geromanos, S., Tempst, P. & Hartl, F. U.** (1993). Identification of nucleotide-binding regions in the chaperonin proteins GroEL and GroES. *Nature* **366**, 279-282.
- Mason, T., Pineda, A. R., Wofsy, C. & Goldstein, B.** (1999). Effective rate models for the analysis of transport-dependent biosensor data. *Math.Biosci.* **159**, 123-144.
- Mazur, S., Tanious, F. A., Ding, D., Kumar, A., Boykin, D. W., Simpson, I. J., Neidle, S. & Wilson, W. D.** (2000). A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation. *J.Mol.Biol.* **300**, 321-337.
- McBroom, L. D. & Sadowski, P. D.** (1994). DNA bending by *Saccharomyces cerevisiae* ABF1 and its proteolytic fragments. *J.Biol.Chem.* **269**, 16461-16468.
- Meisenheimer, K. M. & Koch, T. H.** (1997). Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **32**, 101-140.
- Merrill, B. M., Stone, K. L., Cobianchi, F., Wilson, S. H. & Williams, K. R.** (1988). Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J.Biol.Chem.* **263**, 3307-3313.
- Michalopoulos, I. & Hay, R. T.** (1999). Role of the conserved lysine 80 in stabilisation of NF-kappaB p50 DNA binding. *Nucleic Acids Res.* **27**, 503-509.
- Miyake, T., Loch, C. M. & Li, R.** (2002). Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. *Mol.Cell Biol.* **22**, 505-516.
- Moon, K. Y., Kong, D., Lee, J. K., Raychaudhuri, S. & Hurwitz, J.** (1999). Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 12367-12372.
- Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E.** (2000). Anti UV-damaged DNA Antibiotika. In: Nagata, K. Real-Time Analysis of Biomolecular Interaction, Springer-Verlag Tokyo/Japan, 133-139.
- Moss, T., Dimitrov, S. I. & Houde, D.** (1997). UV-laser crosslinking of proteins to DNA. *Methods* **11**, 225-234.
- Murakami, Y., Huberman, J. A. & Hurwitz, J.** (1996). Identification, purification, and molecular cloning of autonomously replicating sequence-binding protein 1 from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 502-507.
- Myszka, D. G.** (2000). Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIAcore. *Methods Enzymol.* **323:325-40.**, 325-340.
- Natale, D. A., Schubert, A. E. & Kowalski, D.** (1992). DNA helical stability accounts for mutational defects in a yeast replication origin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 2654-2658.
- Neylon, C., Brown, S. E., Kralicek, A. V., Miles, C. S., Love, C. A. & Dixon, N. E.** (2000). Interaction of the *Escherichia coli* replication terminator protein (Tus) with DNA: a model derived from DNA-binding studies of mutant proteins by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **39**, 11989-11999.
- Nice, E. C. & Catimel, B.** (1999). Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays* **21**, 339-352.
- Norris, C. L., Meisenheimer, P. L. & Koch, T. H.** (1996). Mechanistic Studies of the 5-Iodouracil Chromophore Relevant to its use in Nucleoprotein Photo-Cross-Linking. *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 5796-5803.
- Oberye, E. H., Maurer, K., Mager, W. H. & Planta, R. J.** (1993). Structure of the ABF1-homologue from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim.Biophys.Acta* **1173**, 233-236.

- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Soneson, K. K., Hensley, P. & Brooks, I. (1993). Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal.Biochem.* **212**, 457-468.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu.Rev.Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Packham, E. A., Graham, I. R. & Chambers, A. (1996). The multifunctional transcription factors Abf1p, Rap1p and Reb1p are required for full transcriptional activation of the chromosomal PGK gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **250**, 348-356.
- Pond, C. D., Holden, J. A., Schnabel, P. C. & Barrows, L. R. (1997). Surface plasmon resonance analysis of topoisomerase I-DNA binding: effect of Mg²⁺ and DNA sequence. *Anticancer Drugs* **8**, 336-344.
- Pretorius, G. H. & Muller, H. E. (1992). Conservation of binding site specificity of three yeast DNA binding proteins. *FEBS Lett.* **298**, 203-205.
- Quinn, J. G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D. & O'Kennedy, R. (2000). Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal.Biochem.* **281**, 135-143.
- Raychaudhuri, S., Byers, R., Upton, T. & Eisenberg, S. (1997). Functional analysis of a replication origin from *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a new replication enhancer. *Nucleic.Acids.Res.* **25**, 5057-5064.
- Razin, A. & Cedar, H. (1994). DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* **77**, 473-476.
- Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J.* **17**, 4905-4908.
- Record, M. T. J., Ha, J. H. & Fisher, M. A. (1991). Analysis of equilibrium and kinetic measurements to determine thermodynamic origins of stability and specificity and mechanism of formation of site-specific complexes between proteins and helical DNA. *Methods Enzymol.* **208**, 291-343.
- Reed, S. H., Akiyama, M., Stillman, B. & Friedberg, E. C. (1999). Yeast autonomously replicating sequence binding factor is involved in nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **13**, 3052-3058.
- Reid, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. & Struhl, K. (2000). Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol.Cell* **6**, 1297-1307.
- Ren, J., Jenkins, T. C. & Chaires, J. B. (2000). Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* **39**, 8439-8447.
- Rhode, P. R., Elsasser, S. & Campbell, J. L. (1992). Role of multifunctional autonomously replicating sequence binding factor 1 in the initiation of DNA replication and transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **12**, 1064-1077.
- Rhode, P. R., Sweder, K. S., Oegema, K. F. & Campbell, J. L. (1989). The gene encoding ARS-binding factor I is essential for the viability of yeast. *Genes Dev.* **3**, 1926-1939.
- Rich, R. L. & Myszka, D. G. (2001). BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J.Mol.Recognit.* **14**, 223-228.
- Rivier, D. H., Ekena, J. L. & Rine, J. (1999). HMR-I is an origin of replication and a silencer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**, 521-529.
- Roberts, R. W. & Ja, W. W. (1999). In vitro selection of nucleic acids and proteins: What are we learning? *Curr.Opin.Struct.Biol* **9**, 521-529.

- Rolfes, R. J., Zhang, F. & Hinnebusch, A. G.** (1997). The transcriptional activators BAS1, BAS2, and ABF1 bind positive regulatory sites as the critical elements for adenine regulation of ADE5,7. *J.Biol.Chem.* **272**, 13343-13354.
- Rouet-Benzineb, P., Gontero, B., Dreyfus, P. & Lafuma, C.** (2000). Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**, 1767-1778.
- Rowles, A., Chong, J. P., Brown, L., Howell, M., Evan, G. I. & Blow, J. J.** (1996). Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell* **87**, 287-296.
- Rowley, A., Cocker, J. H., Harwood, J. & Diffley, J. F.** (1995). Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *EMBO J.* **14**, 2631-2641.
- Rowley, A., Dowell, S. J. & Diffley, J. F.** (1994). Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges. *Biochim.Biophys.Acta* **1217**, 239-256.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* 2. 1989. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Sauve, D. M., Ho, D. T. & Roberge, M.** (1995). Concentration of dilute protein for gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* **226**, 382-383.
- Savada, J., Suzuki, F.** (2000). Transkription Faktoren. In: Nagata, K. *Real-Time Analysis of Biomolecular Interaction*, Springer-Verlag Tokyo/Japan, 127-132.
- Schmidt, A. M., Herterich, S. U. & Krauss, G.** (1991). A single-stranded DNA binding protein from *S. cerevisiae* specifically recognizes the T-rich strand of the core sequence of ARS elements and discriminates against mutant sequences. *EMBO J.* **10**, 981-985.
- Schroeder, S. C. & Weil, P. A.** (1998a). Biochemical and genetic characterization of the dominant positive element driving transcription of the yeast TBP-encoding gene, SPT15. *Nucleic.Acids.Res.* **26**, 4186-4195.
- Schroeder, S. C. & Weil, P. A.** (1998b). Genetic tests of the role of Abf1p in driving transcription of the yeast TATA box binding protein-encoding gene, SPT15. *J.Biol.Chem.* **273**, 19884-19891.
- Schuck, P. & Minton, A. P.** (1996). Kinetic analysis of biosensor data: elementary tests for self-consistency. *Trends.Biochem.Sci.* **21**, 458-460.
- Seimiya, M. & Kurosawa, Y.** (1996). Kinetics of binding of Antp homeodomain to DNA analyzed by measurements of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* **398**, 279-284.
- Sekiguchi, J. & Shuman, S.** (1996). Identification of contacts between topoisomerase I and its target DNA by site-specific photocrosslinking. *EMBO J.* **15**, 3448-3457.
- Shakibai, N., Kumar, V. & Eisenberg, S.** (1996). The Ku-like protein from *Saccharomyces cerevisiae* is required in vitro for the assembly of a stable multiprotein complex at a eukaryotic origin of replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11569-11574.
- Shamoo, Y., Williams, K. R. & Konigsberg, W. H.** (1988). Photochemical crosslinking of bacteriophage T4 single-stranded DNA-binding protein (gp32) to oligo-p(dT)8: identification of phenylalanine-183 as the site of crosslinking. *Proteins* **4**, 1-6.
- Shetlar, M. D., Christensen, J. & Hom, K.** (1984). Photochemical addition of amino acids and peptides to DNA. *Photochem.Photobiol.* **39**, 125-133.

- Silve, S., Rhode, P. R., Coll, B., Campbell, J. & Poyton, R. O.** (1992). ABF1 is a phosphoprotein and plays a role in carbon source control of COX6 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4197-4208.
- Singer, B. S., Shtatland, T., Brown, D. & Gold, L.** (1997). Libraries for genomic SELEX. *Nucleic Acids Res.* **25**, 781-786.
- Sonksen, C. P., Nordhoff, E., Jansson, O., Malmqvist, M. & Roepstorff, P.** (1998). Combining MALDI mass spectrometry and biomolecular interaction analysis using a biomolecular interaction analysis instrument. *Anal. Chem* **70**, 2731-2736.
- Spolar, R. S. & Record, M. T. J.** (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**, 777-784.
- Springer, C., Krappmann, S., Kunzler, M., Zmasek, C. & Braus, G. H.** (1997). Regulation of the yeast HIS7 gene by the global transcription factor Abf1p. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 136-146.
- Stimson, K. M. & Vertino, P. M.** (2002). Methylation-mediated silencing of TMS1/ASC is accompanied by histone hypoacetylation and CpG island-localized changes in chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* **277**, 4951-4958.
- Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W.** (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* **282**, 39-43.
- Stockley, P. G., Baron, A. J., Wild, C. M., Parsons, I. D., Miller, C. M., Holtham, C. A. & Baumberg, S.** (1998). Dissecting the molecular details of prokaryotic transcriptional control by surface plasmon resonance: the methionine and arginine repressor proteins. *Biosens. Bioelectron.* **13**, 637-650.
- Stuart, J. K., Myszka, D. G., Joss, L., Mitchell, R. S., McDonald, S. M., Xie, Z., Takayama, S., Reed, J. C. & Ely, K. R.** (1998). Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **273**, 22506-22514.
- Stump, W. T. & Hall, K. B.** (1995). Crosslinking of an iodo-uridine-RNA hairpin to a single site on the human U1A N-terminal RNA binding domain. *RNA.* **1**, 55-63.
- Suh, W. C., Burkholder, W. F., Lu, C. Z., Zhao, X., Gottesman, M. E. & Gross, C. A.** (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15223-15228.
- Suh, W. C., Lu, C. Z. & Gross, C. A.** (1999). Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J Biol Chem* **274**, 30534-30539.
- Suzuki, M., Gerstein, M. & Yagi, N.** (1994). Stereochemical basis of DNA recognition by Zn fingers. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3397-3405.
- Sweder, K. S., Rhode, P. R. & Campbell, J. L.** (1988). Purification and characterization of proteins that bind to yeast ARSs. *J. Biol. Chem.* **263**, 17270-17277.
- Tasset, D. M., Kubik, M. F. & Steiner, W.** (1997). Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.* **272**, 688-698.
- Tate, J. J., Persinger, J. & Bartholomew, B.** (1998). Survey of four different photoreactive moieties for DNA photoaffinity labeling of yeast RNA polymerase III transcription complexes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1421-1426.
- Triolo, T. & Sternglanz, R.** (1996). Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* **381**, 251-253.
- Tsai, R. Y. & Reed, R. R.** (1998). Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Mol. Cell Biol* **18**, 6447-6456.

- Tuerk, C. & Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-510.
- Tugal, T., Zou-Yang, X. H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T. & Stillman, B.** (1998). The Orc4p and Orc5p subunits of the Xenopus and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J.Biol.Chem.* **273**, 32421-32429.
- Van Houten, J. V. & Newlon, C. S.** (1990). Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Mol.Cell Biol.* **10**, 3917-3925.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M. D. & Kelly, T. J.** (2001). Assembly of the human origin recognition complex. *J.Biol.Chem.* **276**, 26666-26673.
- Venditti, P., Costanzo, G., Negri, R. & Camilloni, G.** (1994). ABFI contributes to the chromatin organization of *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 B-domain. *Biochim.Biophys.Acta* **1219**, 677-689.
- Wade, P. A.** (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* **23**, 1131-1137.
- Walker, S. S., Francesconi, S. C. & Eisenberg, S.** (1990). A DNA replication enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 4665-4669.
- Wang, Y., Mi, J. & Cao, X.** (2000). Anti-DNA antibodies exhibit different binding motif preferences for single stranded or double stranded DNA. *Immunol.Lett.* **73**, 29-34.
- Webster, C. I., Cooper, M. A., Packman, L. C., Williams, D. H. & Gray, J. C.** (2000). Kinetic analysis of high-mobility-group proteins HMG-1 and HMG-I/Y binding to cholesterol-tagged DNA on a supported lipid monolayer. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1618-1624.
- Wedler, G.** (1997). Lehrbuch der physikalischen Chemie. Weinheim, Wiley-VCH.
- Wessel, D. & Flugge, U. I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal.Biochem.* **138**, 141-143.
- Williams, K. R. & Konigsberg, W. H.** (1991). Identification of amino acid residues at interface of protein-nucleic acid complexes by photochemical cross-linking. *Methods Enzymol.* **208**, 516-539.
- Willis, M. C., Hicke, B. J., Uhlenbeck, O. C., Cech, T. R. & Koch, T. H.** (1993). Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins. *Science* **262**, 1255-1257.
- Wilson, D. S. & Szostak, J. W.** (1999). In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 611-647.
- Wiltshire, S., Raychaudhuri, S. & Eisenberg, S.** (1997). An Abf1p C-terminal region lacking transcriptional activation potential stimulates a yeast origin of replication. *Nucleic.Acids.Res.* **25**, 4250-4256.
- Wolfe, S. A., Nekludova, L. & Pabo, C. O.** (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **29**, 183-212.
- Wolffe, A. P.** (2000). Transcriptional control: imprinting insulation. *Curr.Biol.* **10**, R463-R465.
- Wright, M. C. & Joyce, G. F.** (1997). Continuous in vitro evolution of catalytic function. *Science* **276**, 614-617.
- Wu, J., Gage, D. A. & Watson, J. T.** (1996). A strategy to locate cysteine residues in proteins by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal.Biochem.* **235**, 161-174.
- Yamamoto, A., Ando, Y., Yoshioka, K., Saito, K., Tanabe, T., Shirakawa, H. & Yoshida, M.** (1997). Difference in affinity for DNA between HMG proteins 1 and 2 determined by surface plasmon resonance measurements. *J Biochem.(Tokyo.)* **122**, 586-594.

- Yang, S. W. & Nash, H. A.** (1994). Specific photocrosslinking of DNA-protein complexes: identification of contacts between integration host factor and its target DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 12183-12187.
- Yang, W. P., Wu, H. & Barbas, C. F.** (1995). Surface plasmon resonance based kinetic studies of zinc finger-DNA interactions. *J Immunol.Methods* **183**, 175-182.
- Yoo, H. Y., Jung, S. Y., Kim, Y. H., Kim, J., Jung, G. & Rho, H. M.** (1995). Transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* ADH1 gene by autonomously replicating sequence binding factor 1. *Curr.Microbiol.* **31**, 163-168.
- Zeidler, R., Hobert, O., Johannes, L., Faulhammer, H. & Krauss, G.** (1993). Characterization of two novel single-stranded DNA-specific autonomously replicating sequence-binding proteins from *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is adenylosuccinate synthetase. *J.Biol.Chem.* **268**, 20191-20197.
- Zofall, M. & Bartholomew, B.** (2000). Two novel dATP analogs for DNA photoaffinity labeling. *Nucleic.Acids.Res.* **28**, 4382-4390.

Danksagung

Vielen Dank

...an Prof. Dr. G. Krauss für die Überlassung des herausfordernden Themas und für die Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung desselben gewährt hat sowie für die finanzielle Unterstützung während der Doktorarbeit.

...an Prof. Dr. M. Sprinzl für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Biosynthese der Proteine und Regulation ihrer Aktivität“ und für die Unterstützung bei der Beantragung des Stipendiums.

...an Prof. Dr. G. Krausch für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, SPR-Messungen durchzuführen.

...an Prof. Dr. U. Lindgren und alle Frauenbeauftragten der Universität Bayreuth für ihre finanzielle Unterstützung in der letzten Phase der Doktorarbeit.

...an Prof. Dr. E. Komor für die Unterstützung bei der Beantragung des Stipendiums und unterhaltsame Gespräche.

...an Georg für viele wertvolle Tipps und Diskussionen, die sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowie für das Korrekturlesen.

...an Helmut für seine Unterstützung und hilfsreiche Diskussionen. Ohne ihn wären die Computer-Probleme und manche Auswertungen nicht so leicht zu bewältigen gewesen.

...an M. Wiechmann für das sorgfältige Lesen des Manuskripts.

...an Jörg für das Korrekturlesen des Methoden-Teils.

...an Marina für ihre fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen.

...an alle ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe, die für das gute Arbeitsklima sorgten.

...an die AG Krausch für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

...an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Sprinzl.

...an Yiwei für die für die Tipps und Tricks rundum die Computer.

...an Dr. H. Faulhammer für die Peptidsequenzierung.

...an Dr. M. Lanzendörfer für die Einführung in die MALDI-MS-Technik.

...an K. Jäger für die Hilfe bei der Arbeit mit dem XeCl-Laser.

...an Marina Lyetska für die AFM-Bilder des ABF1-Proteins.

...an Frank für sein offenes Ohr bei SPR-Auswertungsproblemen und für Fahrradtouren durch die fränkischen Hügel.

...an die Diplomanden Markus und Gabriel. Die Zusammenarbeit am Biacore-Gerät war sowohl fruchtbar als auch unterhaltsam.

...an meine Freundinnen und Freunde, die auch außerhalb Deutschlands mir mit ihrem Rat und Tat zur Seite standen.

...an meinen Bruder Julius und Agn e, ihre Besuche waren ein gutes Mittel gegen mein Heimweh.

...an meine Familie, besonders meine Eltern, auf ihre Unterstützung und ihr Verständnis konnte ich immer zählen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Bayreuth, den 15.05.2002

Rasa Beinoravičiūtė-Kellner