

Entwicklung eines programmierbaren Restriktionsenzym

**Entwicklung eines programmierbaren
Restriktionsenzym**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

-Dr. rer. nat.-

vorgelegt von

Kristin Eisenschmidt

Angefertigt am Institut für Biochemie des Fachbereiches
Biologie/Chemie/Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen

Giessen, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie des Fachbereiches 08 (Biologie/Chemie/Geowissenschaften) der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Pingoud durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. A. Pingoud
Institut für Biochemie,
FB Biologie/Chemie/Geowissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Koreferent: Prof.Dr. R. Renkawitz
Institut für Genetik
FB Biologie/Chemie/Geowissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Zitate, die ich anderen Arbeiten oder Untersuchungen dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Kristin Eisenschmidt

Giessen, den 07.01.2005

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Alfred Pingoud für die direkte Betreuung meiner Doktorarbeit, die wissenschaftliche Unterstützung, insbesondere auch auf den EU-meetings, das stete Interesse an meiner Arbeit und seine unendliche Geduld bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Rainer Renkawitz bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Marc E. Brackertz danke ich ganz besonders für die liebevolle Unterstützung und die vielen Diskussionsabende, die mich nicht nur zum Weitermachen motivierten, sondern insbesondere zu vielen erfolgreichen Ideen inspirierten.

Meinen Eltern und Geschwistern danke dafür, dass sie immer hinter mir stehen und Nachsicht üben, wenn ich mein Wochenende lieber im Labor verbracht habe, statt sie zu hause zu besuchen.

Sebastian R. Scholz und Gregor Meiß danke ich sehr für die Unterstützung bei meinen Kernlokalisierungsexperimenten und die vielen Nerven, die sie beim Korrekturlesen meiner Texte lassen mussten.

Andrea Hermann danke ich für die Freundschaft, die netten Gespräche, ihre Großzügigkeit und das gute Essen.

Bei Ina Steindorf und Tobias Ullrich möchte ich mich bedanken, da wir viel Spaß im Labor zusammen hatten und „Die Schublade“ eine nie versiegende Quelle mit Nervennahrung war.

Thomas Lanio danke ich für seine Unterstützung „beim Endspurt“ meiner Doktorarbeit, für kleine private Tipps und das Riesenschnitzel.

Vera Pingoud, Wolfgang Wende und Peter Friedhoff danke ich für zahlreiche wissenschaftliche Tipps.

Präsentationen: Poster

GBM meeting Mosbach, 2001

K. Eisenschmidt, T. Lanio, A. Jeltsch, A. Pingoud

A Fluorimetric Assay for Online Detection of DNA Cleavage of Restriction Endonucleases

FEBS meeting Lissabon, 2002

K. Eisenschmidt, T. Lanio, A. Jeltsch, A. Pingoud

A Fluorimetric Assay for Online Detection of DNA Cleavage of Restriction Endonucleases

ELSO meeting Dresden, 2003

K. Eisenschmidt, S.R. Scholz, G. Meiss, A. Pingoud

The prokaryotic restriction endonuclease PvuII can be transiently expressed in HeLa cells and targeted to the nucleus, where it cleaves DNA

Präsentationen: Vorträge

EU meeting Newcastle (England, November 2002)

Design of a Site-Specific, Oligonucleotide-Directed Restriction Enzyme

EU meeting Mailand (Italien, März 2003)

Design of a Site-Specific, Oligonucleotide-Directed Restriction Enzyme

EU meeting Berlin (Deutschland, Juli 2003)

Design of a Site-Specific, Oligonucleotide-Directed Restriction Enzyme

EU meeting Szeged (Ungarn, März 2004)

Design of a Site-Specific, Oligonucleotide-Directed Restriction Enzyme

EU meeting Frankfurt (Deutschland, Juli 2004)

Design of a Site-Specific, Oligonucleotide-Directed Restriction Enzyme

Patentanmeldung:

Hochspezifisch mit DNA interagierende Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| μ | MIKRO (10^{-6}) |
| %(v/v) | Volumenprozent pro Volumen |
| %(w/v) | Gewichtsprozent pro Volumen |
| AAP | Agaroseauftragspuffer |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5`-triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | 1, 4 – Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylendiox-bis(ethylenenitrilol)tetra acetic acid |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| GMBS | N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid |
| LB | Luria-Bertani |
| M | Molar |
| min | Minute |
| n | nano |

| | |
|------------|--|
| NTP | Nukeosidtriphosphat |
| OD | Optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| sc | single-chain |
| SDS | <i>sodiumdodecylsulfat</i> |
| s | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-HCl-EDTA-Puffer |
| TEMED | N, N, N', N' , - Teramethylethylendiamin |
| TFS | <i>triple-helix-forming site</i> (TFS, Tripelhelix-Bindungsstelle) |
| TPE | Tris-Phosphat-EDTA-Puffer |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| U | <i>units</i> (Enzymaktivität) |
| wt | Wildtyp |

Als Dezimaltrennzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt verwendet. Aminosäuren werden mit den international üblichen Drei-Buchstaben- bzw. Ein-Buchstaben-Codes abgekürzt. Alle

in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind Oligodesoxynukleotide. Abkürzungen von SI-Einheiten werden nicht näher erläutert.

In der vorliegenden Arbeit wird, solange nicht anders bezeichnet, die scPvuII_{G₄H₆C}-Variante im TFO-scPvuII Heterokonjugat verwendet.

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Oligonukleotide in der Gen-Therapie | 2 |
| 1.1.1 | TFO | 3 |
| 1.1.2 | Chimäre RNA-DNA Oligonukleotide (RDO)..... | 5 |
| 1.1.3 | ODN | 6 |
| 1.1.4 | PNA..... | 7 |
| 1.2 | Restriktionsenzyme | 8 |
| 1.2.1 | Typ II Restriktionsenzyme | 9 |
| 1.3 | „Protein Engineering“ | 13 |
| 1.4 | Zielsetzung | 15 |
| 2 | Materialien und Methoden | 17 |
| 2.1 | Materialien und Biochemikalien..... | 17 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 17 |
| 2.1.2 | Radiochemikalien..... | 18 |
| 2.1.3 | Enzyme..... | 18 |
| 2.1.4 | Oligodesoxyribonukleotide | 19 |
| 2.2 | Mikrobiologische Arbeiten | 20 |
| 2.2.1 | Plasmide | 20 |
| 2.3 | Zellbiologische Arbeiten | 23 |
| 2.3.1 | 1.4.1. Kernlokalisationsexperimente | 24 |
| 2.4 | Molekularbiologische Arbeiten..... | 25 |
| 2.4.1 | Analyse von DNA-Fragmenten..... | 25 |
| 2.4.2 | Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 26 |
| 2.4.3 | „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) | 26 |
| 2.4.4 | Substratherstellung mit Hilfe PCR..... | 27 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.4.5 | Mutagenese-PCR..... | 29 |
| 2.4.6 | ³² P-Markierung..... | 34 |
| 2.4.7 | TFO-scPvuII Herstellung: Kopplungsreaktion | 35 |
| 2.4.8 | Nachweis der <i>triple-helix</i> | 36 |
| 2.5 | Proteinbiochemische Methoden | 38 |
| 2.5.1 | Proteinaufreinigung..... | 38 |
| 2.5.2 | Analyse..... | 39 |
| 2.6 | Enzymatische Charakterisierung | 43 |
| 2.6.1 | Adressierte Spaltung | 43 |
| 3 | Ergebnisse | 46 |
| 3.1 | Bindungsaktivitäten von TFOs via triple-helix Bildung..... | 46 |
| 3.1.1 | Circular Dichroismus (CD) | 47 |
| 3.1.2 | „ <i>electrophoretic mobility shift assay</i> “ | 49 |
| 3.1.3 | „ <i>cleavage protection assay</i> “ | 51 |
| 3.2 | Konstruktion und Herstellung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates | 52 |
| 3.2.1 | Herstellung der scPvuIIH ₆ G ₄ C Variante | 52 |
| 3.2.2 | Analyse der scPvuIIH ₆ G ₄ C Variante mittels Fluoreszenzanisotropie-Messung..... | 53 |
| 3.2.3 | Herstellung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates | 54 |
| 3.2.4 | Kontrollspaltung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates..... | 57 |
| 3.3 | Adressierte Spaltung durch das TFO-scPvuII-Heterokonjugat..... | 58 |
| 3.3.1 | Adressierte Spaltung von PCR-Produkten | 58 |
| 3.3.2 | Adressierte Spaltung von Plasmid-DNA..... | 66 |
| 3.4 | Kernlokalisierungsexperimente..... | 71 |
| 3.4.1 | Analyse der Fusionsproteine <i>in vivo</i> | 71 |
| 3.4.2 | Identifizierung der Fusionsproteine mittels Western-Blot..... | 73 |
| 3.4.3 | Nachweis der Spaltspezifität der Fusionsproteine | 74 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4 | Diskussion..... | 75 |
| 4.1 | Das Restriktionsenzym scPvuIIH ₆ G ₄ C..... | 76 |
| 4.2 | Analyse der Bindungseigenschaften von TFOs | 77 |
| 4.3 | Herstellung des scPvuII-TFO-Heterokonjugates..... | 79 |
| 4.3.1 | Kopplung von GMBS und TFO | 79 |
| 4.3.2 | Kopplung des TFO-GMBS Konjugates mit scPvuII..... | 80 |
| 4.3.3 | Reinigung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates | 80 |
| 4.4 | Adressierte Spaltung | 81 |
| 4.4.1 | Adressierte Spaltung von PCR-Substraten..... | 81 |
| 4.4.2 | Adressierte Spaltung in Abhängigkeit von der Ionenstärke..... | 84 |
| 4.4.3 | Adressierte Spaltung von makromolekularem Substrat..... | 85 |
| 4.4.4 | Adressierte Spaltung in Konkurrenz mit λ-DNA..... | 86 |
| 4.5 | Anwendung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates in vivo..... | 87 |
| 4.5.1 | Kernlokalisierungsexperimente | 88 |
| 5. | Zusammenfassung | 91 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 93 |

1 Einleitung

Gentherapie ist eine neue und viel versprechende Möglichkeit, Krankheiten zu heilen, die durch ein defektes Gen ausgelöst werden. Dabei wird genetische Information in die Erbsubstanz einer Zelle künstlich eingeschleust, um den defekten Genabschnitt zu ersetzen. Diese neue Erbinformation soll gezielt den Phänotyp der Zellen verändern. Voraussetzung dieser Veränderungen sind jedoch die genauen Kenntnisse über Sequenz, Struktur und Funktion der zelleigenen Gene. Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms in den letzten Jahren können nun Struktur und Funktion der Gene besser untersucht werden. Dadurch erhält man auch Informationen darüber, welches Krankheitsbild von welcher Mutation im Gen verursacht wird.

Man unterscheidet die somatische Gentherapie, bei der die genetische Manipulation nur in bestimmten Körperzellen erfolgt, von der Keimbahntherapie, bei der das genetische Material in die Keimbahnzellen eingeschleust wird und somit weitervererbt werden kann.

Mit Hilfe der somatischen Gentherapie kann bei einer monogenetischen Krankheit eine bekannte Mutation eines kritischen Genes so verändert werden, dass der krankhafte Phänotyp revertiert wird. Dafür wird ein therapeutisches Gen unter Zuhilfenahme von Vektoren in die entsprechenden Zellen eingeschleust. Problematisch ist jedoch eine mögliche unkontrollierte Insertion dieses Genes ins Genom, da dies wieder mutagene Folgen hervorruft.

Durch die Erzeugung von Doppelstrangbrüchen an einer definierten Stelle im Genom würde der Prozess der homologen Rekombination ausgelöst werden, welcher die zielgerichtete Integration des therapeutischen Genes an der gewünschten Stelle zur Folge hätte. Deshalb ist ein Hauptanliegen bei der Etablierung der Gentherapie, ein Werkzeug zu finden, das hochspezifisch und adressiert im Genom spalten kann, um die gewünschten Doppelstrangbrüche zur Induktion der homologen Rekombination zu erzeugen. Diese hochspezifische Adressierung bedarf deshalb Erkennungssequenzen, die so lang sind, dass sie nur einmal im Genom vorkommen.

Restriktionsendonukleasen sind hoch-sequenzspezifische Enzyme [Pingoud and Jeltsch, 1997; Pingoud and Jeltsch, 2001], weshalb sie nicht nur für die Analyse und Rekombination von DNA eingesetzt werden, sondern auch als Modellsysteme zur Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen dienen. So untersucht man an ihnen z.B. wie Proteine ihre Erkennungssequenz mit hoher Spezifität erkennen und wie diese Erkennung effizient an die

Katalyse geknüpft ist. Restriktionsenzyme werden aber auch in biotechnologischen Anwendungen, wie Klonierungen, genutzt.

Eine andere Möglichkeit der spezifischen Erkennung bestimmter Sequenzen im Genom ist die Verwendung von Oligonukleotiden. Diese binden spezifisch an doppelsträngige DNA unter Ausbildung einer *triple-helix*.

In der vorliegenden Arbeit werden die Eigenschaften von Restriktionsendonuklease und Oligonukleotid miteinander gekoppelt und dergestalt optimiert, dass ein hochspezifisches programmierbares Enzym-Oligonukleotid-Konjugat entsteht. Als Enzym wurde dafür die *single-chain* Variante von PvuII (scPvuII) [Simoncsits et al., 2001] verwendet und als Oligonukleotid ein modifiziertes 16 bp langes *triple-helix forming* Oligonukleotid (TFO).

1.1 Oligonukleotide in der Gen-Therapie

Ein neuartiger Ansatz in der Getherapie ist das gezielte Adressieren von Oligonukleotiden an DNA-Sequenzen, die geändert werden sollen. Diese Änderungen resultieren aus den Basenaustauschen, die durch die Stimulation des DNA-Reparaturmechanismus durch das Oligonukleotid induziert werden [Seidman and Glazer, 2003].

Oligonukleotide haben vier entscheidende Vorteile: 1) Ihre Strukturen sind einfach und können dementsprechend künstlich synthetisiert werden. 2) Genetische Defekte können mit ihnen in der natürlichen chromosomalen Umgebung adressiert werden. 3) Es können modifizierte Basen, Komponenten des DNA-Rückgrates und reaktive chemische Gruppen zur Verbesserung ihrer Stabilität eingeführt werden. 4) Sie lösen keine Immunantwort aus.

Bisher wurden Oligonukleotide auf RNA-Ebene (RNAi, *gene silencing*) und auf DNA-Ebene (TFO = *triple-helix forming* Oligonukleotid, RDO = chimäres RNA-DNA Oligonukleotid, ODN = kurzes, modifiziertes, einzelsträngiges Oligodesoxynukleotid, PNA = TFO mit Peptidrückgrat) verwendet.

1.1.1 TFO

Triple-helix forming Oligonukleotide (TFOs) binden in der großen Furche der DNA unter Ausbildung einer *triple-helix*. Diese Bindung erfolgt spezifisch an homopurin- oder homopyrimidinreiche Sequenzen der Doppelhelix. Die DNA-Doppelhelix wird durch Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Die *triple-helix* Bildung erfolgt durch

Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindung des TFOs mit dem Purin-Strang des Watson-Crick-Doppelstranges. Dabei kann die Bindung des TFOs in paralleler oder antiparalleler Orientierung hinsichtlich des Purin-Stranges stattfinden, so dass man demzufolge zwei Bindungsarten unterscheidet: das Pyrimidin-Motiv (parallele Bindung; Abb. 1-1a) und das Purin-Motiv (antiparallele Bindung; Abb. 1-1b). Aufgrund des negativ geladenen DNA-Zuckerrückgrates unterliegt der dritte Strang einer starken elektrostatischen Abstoßung. Diese kann durch die Zugabe von positiven Ionen oder aminoglycosidische Komponenten, wie z.B. Neomycin, oder Polyaminen, wie z.B. Spermin, überwunden werden [Arimondo et al., 1999; Arya et al., 2001; Xue et al., 2002].

Das Pyrimidin-Motiv ist bei physiologischem pH nicht stabil, da für die Hoogsteen-Basenpaarung das Cytosin protoniert vorliegen muss. Dies geschieht aber erst im sauren pH-Bereich ($pK_a=4.5$) [Singleton and Dervan, 1992]. Verwendet man aber 5-Methylcytosin anstelle von Cytosin, so kann diese Abstoßung überwunden werden, da die Methylgruppe in der großen Furche der DNA die Wassermoleküle verdrängt und am Basen-*stacking* teilnimmt [Xodo et al., 1991]. Eine weitere Möglichkeit die *triple-helix* Stabilität zu verbessern, ist die Verwendung von Propynyl-uracil anstelle von Thymin [Lacroix et al., 1999; Mills et al., 2002; Phipps et al., 1998].

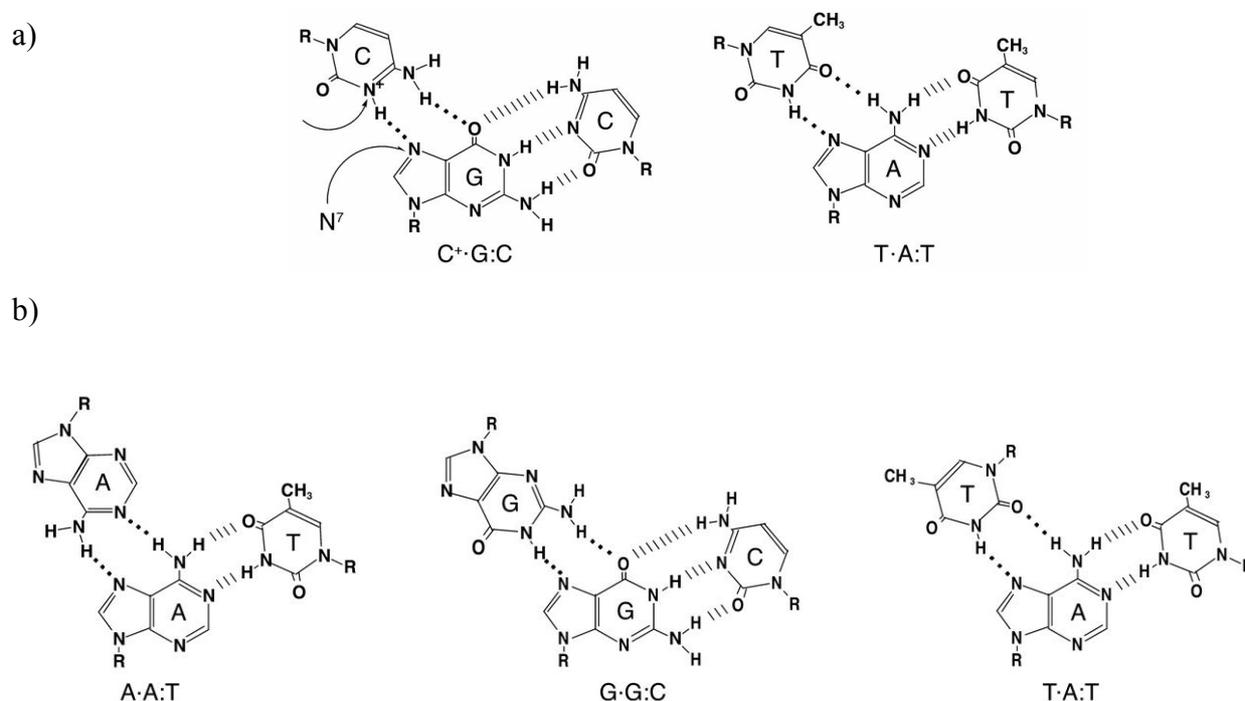


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung *triple-helix*-Bildung durch Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindung (gepunktete Linien) im Vergleich zum Watson-Crick-Basenpaar (gestrichelte Linien); a) Pyrimidin-Motiv; b) Purin-Motiv [Seidman and Glazer, 2003]

TFOs können auch zur Stimulation der Rekombination an einer spezifischen Stelle im Genom verwendet werden. Dafür werden TFOs mit Psoralen (eine Substanz, die mit Licht reagiert und als Medikament für verschiedene Hautkrankheiten benutzt wird) gekoppelt. Psoralen interkaliert in die DNA und bildet an dieser Stelle Crosslinks, was zu Mutationen, insbesondere nach UV-Bestrahlung, führt. Wird ein TFO-Psoralen-Konjugat nach *triple-helix*-Bildung mit UV-Licht bestrahlt, dann erfolgt in dessen Nähe eine vermehrte DNA-Schädigung, die in einer vermehrten homologen Rekombination mit einem außerchromosomalen Vektor resultiert. Dies konnte für somatischen Zellen und Stammzellen gezeigt werden [Liu et al., 2002; Rice et al., 2001].

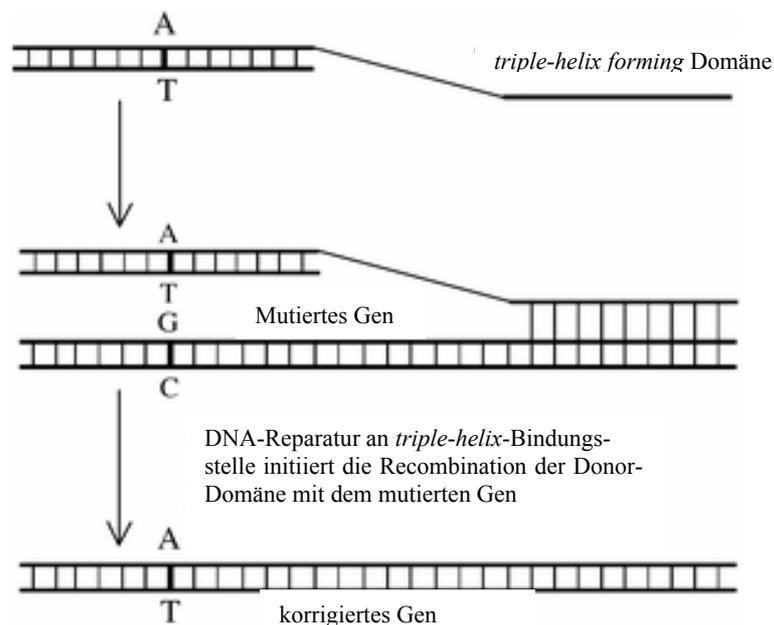


Abbildung 1-2 TFO-erzeugte Genumwandlung. An ein TFO ist ein Donor-DNA-Fragment gekoppelt, das für die homologe Rekombination und den nachfolgenden Informationstransfer konstruiert wurde. In dieser Figur sind Donor-DNA und Zielsequenz bis auf das GC-Basenpaar identisch. Die *triple-helix*-Bindung löst die DNA-Reparatur aus, wobei die Donor-DNA als Sequenzinformation genutzt wird, so dass das GC-Basenpaar durch das neue AT-Basenpaar ersetzt wird [Liu et al., 2002].

Aber TFOs können jedoch auch ohne deren Kopplung an DNA-zerstörende Agenzien homologe Rekombination auslösen, wofür vermutlich der Nukleotid-Entfernungs-Reparaturmechanismus (NER = *nucleotide excision repair pathway*) verantwortlich ist [Bailey and Weeks, 2000; Bailey et al., 1998] (Abbildung 1-2).

Außerdem können TFOs zur Inhibition der Transkription verwendet werden, denn die Ausbildung einer *triple-helix* verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Bildung des Initiationskomplexes oder die Elongation [Bello-Roufai et al., 2004; Dieci et al., 2001; Diviacco et al., 2001; Ebbinghaus et al., 1999; Fakler et al., 1994; Faria et al., 2000; Faria et

al., 2001; Helene et al., 1997; Maher, 1992; Sarkar and Brahmachari, 1992; Wang and Rana, 1997; Young et al., 1991].

1.1.2 Chimäre RNA-DNA Oligonukleotide (RDO)

Chimäre RNA-DNA-Oligonukleotide wurden aufgrund der Beobachtung, dass Oligonukleotide aus DNA und RNA bessere Bindungseigenschaften als TFOs zu genomischer DNA aufweisen, zur *triple-helix* Bildung verwendet. Verschiedene Bindungsexperimente haben gezeigt, dass ein RDO-Duplex, bestehend aus einem RNA-Strang, dessen Riboserückgrat, um RNaseH-Abbau zu vermeiden, methyliert ist, und einem DNA-Strang den endogenen Reparaturmechanismus am besten stimuliert: der RNA-Strang begünstigt die stabile Bindung, während der DNA-Strang als Sequenzinformation dient.

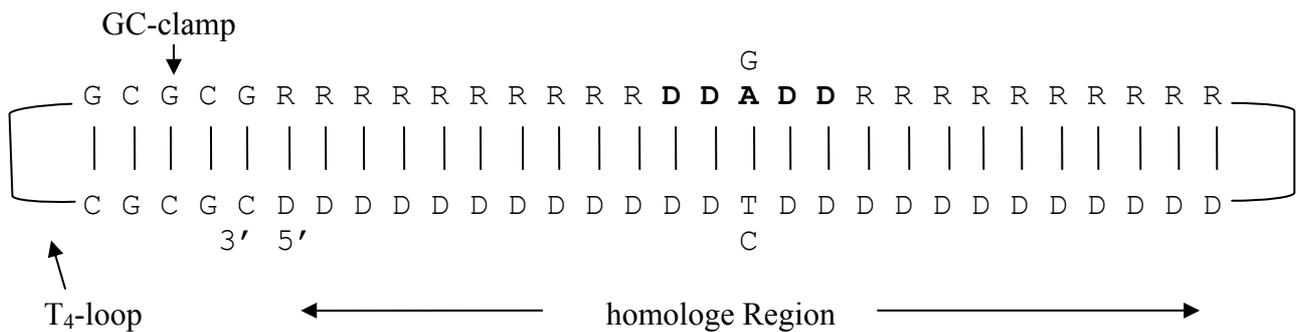


Abbildung 1-3: Struktur eines RDO. RDOs bestehen typischerweise aus 68 Nukleotiden, zusammengesetzt aus einem RNA-Strang (R) und einem DNA-Strang (D), die durch zwei T₄-loops und einer 5 bp-„Klammer“ miteinander verknüpft sind. Beide Stränge sind zueinander komplementär. Der RNA-Strang besteht aus 2-methyl-RNA Resten (R), die einen mittleren 5 bp-Bereich flankieren (D), der auch die Basenfehlpaarung trägt. Damit ist der RNA-Strang über 25 bp (bis auf die Basefehlpaarung G:A) zur Ziel-DNA komplementär [Liu et al., 2002].

Die Induktion des Reparaturmechanismus erfolgt in zwei Phasen. Zuerst bindet der RNA-Strang an eine zu ihm homologe Sequenz der Ziel-DNA, was durch Bindeproteine im Rekombinationsmechanismus, wie zB. RecA in Bakterien oder hRad51 in Säugerzellen, katalysiert wird. In der zweiten Phase erfolgen die Erkennung der Basenfehlpaarung, das Herausschneiden der entsprechenden Basen und die anschließende Reparatur durch DNA-Polymerasen und Ligasen.

1.1.3 ODN

Kurze einzelsträngige Oligonukleotide (ODNs) stimulieren den Reparaturmechanismus einer Zelle wesentlich effektiver als RDOs [Liu et al., 2002]. Die Wirkung der ODNs beruht darauf, dass der Einzelstrang eine stabile *triple-helix* bildet, jedoch eine intrinsische Basenfehlpaarung hinsichtlich seiner Zielsequenz im DNA-Doppelstrang trägt (Abbildung 1-4). Der durch die ausgebildete *triple-helix* stimulierte Reparaturmechanismus bewirkt nun den Austausch dieser fehlgepaarten Basen im Doppelstrang, so dass die Zielsequenz spezifisch verändert werden kann. Damit wurde eine neue Strategie zur Genkorrektur, die auf einem Basenaustausch beruht, auch *in vivo* möglich [Gamper et al., 2000]. Dennoch müssen noch weitere Untersuchungen folgen, um den genauen Reparaturmechanismus zu verifizieren.

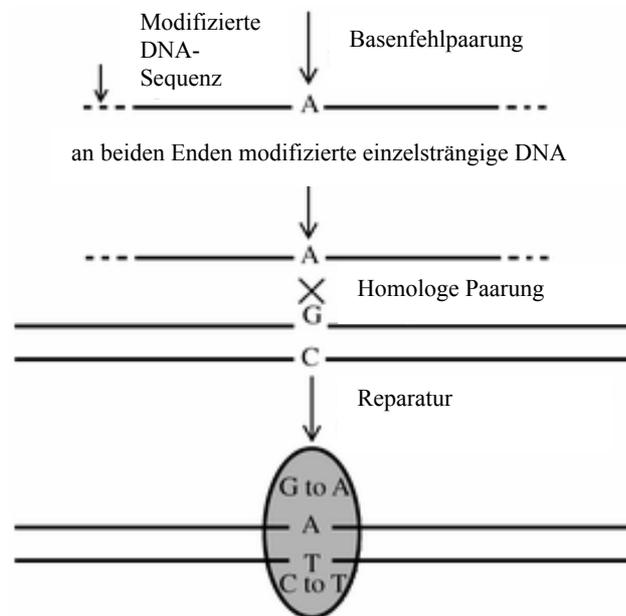


Abbildung 1-4: Das ODN (ist gegen Nukleaseabbau an beiden Enden modifiziert) ist mit Ausnahme einer Basenfehlpaarung komplementär zur Zielsequenz [Liu et al., 2002]

Ein weiterer Vorteil von ODNs gegenüber den RNA-DNA-Chimären besteht darin, dass sie leichter und billiger in der Herstellung sind, aber ähnliches therapeutisches Potential besitzen.

1.1.4 PNA

Peptide nucleic acids (PNAs) sind synthetische Oligonukleotide mit modifiziertem Rückgrat [Falkiewicz et al., 1999; Nielsen et al., 1991; Pellestor and Paulasova, 2004]: das Zuckerrückgrat ist durch ein peptidartiges Rückgrat ersetzt worden (Abb.1-5).

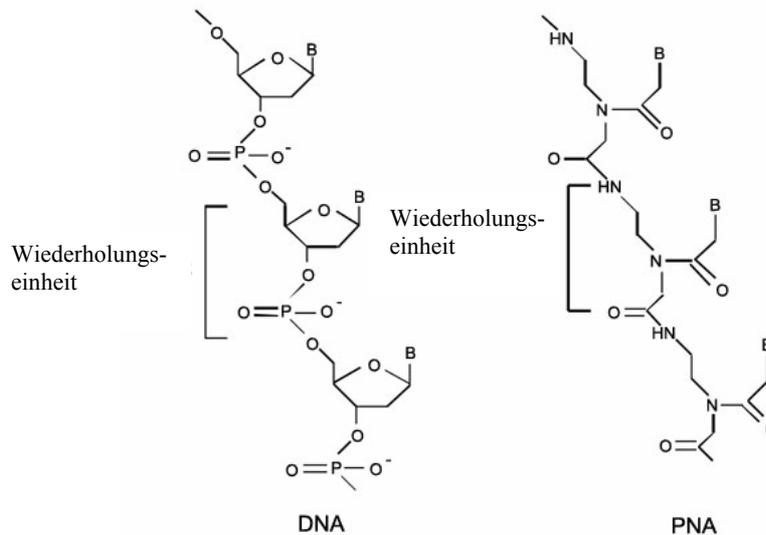


Abbildung 1-5: Vergleich der Strukturen von DNA und PNA [Wang and Xu, 2004]

PNAs können mit DNA- und RNA- Einzelsträngen sequenzspezifische Doppelstränge bilden und werden deshalb verwendet, um z.B. durch Bindung an mRNAs die Translation zu inhibieren. Dabei erfolgt die Doppelstrangbildung mit PNAs wesentlich besser als bei RNA/RNA oder DNA/DNA Doppelsträngen. Dies ist auf das ungeladene Peptid-Rückgrat zurückzuführen, das keine elektrostatische Abstoßung erzeugt.

PNAs können aber auch an homopurin- oder homopyrimidinreiche DNA-Doppelstränge binden, indem der PNA-Strang in den Doppelstrang eindringt, einen DNA-Strang verdrängt und somit einen einzelsträngigen DNA-Strang, den sogenannten D-loop, an der PNA-Bindungsstelle erzeugt. Dabei bildet die PNA eine PNA/DNA/PNA-*triple-helix*, denn nachdem das erste PNA-Molekül in die DNA eingewandert ist und einen Doppelstrang sowie den einzelsträngigen DNA-D-*loop* ausgebildet hat, bindet ein zweites PNA-Molekül den PNA/DNA-Duplex unter Ausbildung einer *triple-helix*, während der D-*loop* einzelsträngig bleibt.

Aufgrund ihres besonderen Rückgrates sind PNAs in Zellen äußerst stabil, da sie nicht durch Nukleasen oder Proteasen abgebaut werden können [Bajor et al., 2003; Borgatti et al., 2003; Wang and Xu, 2004]. Wegen dieser Eigenschaften werden PNAs zur Inhibition der Genexpression sowie in Untersuchungen zur homologen Rekombination *in vivo* verwendet. Jedoch haben auch PNAs nur begrenzte Anwendungsmöglichkeiten, denn sie werden nicht wie DNA oder RNA durch Endozytose von den Zellen aufgenommen [Hanvey et al., 1992]. Dennoch haben PNAs großes therapeutisches Potential vor allem in der Regulation der Genexpression.

1.2 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden erstmalig vor 50 Jahren beschrieben. Für ihre Entdeckung und Anwendung in der molekularen Genetik wurde 1978 der Nobel-Preis in Physiologie und Medizin an Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Smith vergeben. Später erkannte man das enorme Potential der Verwendung von Restriktionsenzymen in der Gentechnik, wo sie unentbehrlich geworden sind.

In Prokaryoten kommen Restriktionsenzyme, bis auf einige Ausnahmen, z.B. DpnI, als Teil eines Restriktions-Modifikationssystems immer in Zusammenhang mit einer Methyltransferase vor, die die gleiche Erkennungssequenz wie das zugehörige Restriktionsenzym hat. Die Methylierung von Adenin oder Cytosin in dieser Sequenz verhindert die Spaltung der DNA durch das Restriktionsenzym, da das Restriktionsenzym diese methylierte Sequenz nun nicht mehr spalten kann. Somit schützt die Methyltransferase die zelleigene DNA vor dem Restriktionsverdau durch das eigene Restriktionsenzym. Gleichzeitig schützt das Restriktions-Modifikationssystem (R-M System) die Zelle vor eindringender Fremd-DNA, wie z.B. Viren oder Plasmide, da diese DNA nicht durch Methylierung vor dem Restriktionsverdau geschützt ist (*cellular defense hypothesis*).

Die Expression von Restriktionsenzym und Methyltransferase eines Restriktions-Modifikations-System sind oftmals eng miteinander gekoppelt. Das Vorhandensein beider Enzyme innerhalb einer Zelle zur gleichen Zeit hat eine kinetische Kompetition der beiden Enzyme zur Folge, wobei die Restriktionsendonuklease die eindringende Fremd-DNA zerstören muss, bevor die Fremd-DNA von der Methyltransferase methyliert und damit vor dem Restriktionsverdau geschützt wird. Somit muss die Restriktionsendonuklease ihre spezifische Sequenz in der Fremd-DNA äußerst schnell erreichen und spalten, bevor sie methyliert und ins Wirtsgenom integriert wird. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Restriktionsendonuklease ihre Sequenz in erleichterter Diffusion erreicht [Ehbrecht et al., 1985; Jack et al., 1982; Terry et al., 1985]. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, ob diesem Prozess ein *sliding*-Mechanismus zugrunde liegt [Berkhout and van Wamel, 1996; Jeltsch et al., 1994; Jeltsch and Pingoud, 1998; Jeltsch et al., 1996a; Schulze et al., 1998], bei dem die Bewegung eines Proteins entlang der DNA erfolgt, wobei das Protein in unspezifischer Weise an die DNA gebunden bleibt, oder ob er einem *hopping*- Mechanismus zugrunde folgt, bei dem das Protein kurzzeitig von der DNA dissoziiert, um danach mehr oder weniger sofort wieder an anderer Stelle gebunden zu werden [Gowers and Halford, 2003; Halford, 2001; Halford and Marko, 2004; Halford and Szczelkun, 2002; Jeltsch et al., 1994].

Eine andere Hypothese betrachtet das Restriktions-Modifikations-System als kleinste lebende Einheit, ähnlich wie Viren oder Transposons (*selfish gene hypothesis*) [Kobayashi, 1998; Kobayashi, 2001; Kusano et al., 1995; Naito et al., 1995]. Durch horizontalen Gentransfer können R-M Systeme in ein neues Genom integriert werden, wenn durch die Spaltaktivität des Restriktionsenzym homologe Rekombinationsmechanismen ausgelöst werden, bei denen das R-M System ins Genom eingebaut wird. Dieses Verhalten ähnelt stark dem von Homingendonukleasen [Gimble, 2000]. Demnach können R-M Systeme auch als eine Art intrazelluläre Parasiten betrachtet werden.

Die Variationshypothese (*variation hypothesis*) nimmt an, dass Restriktions-Modifikations-Systeme für genetische Diversität verantwortlich sind. Sie induzieren infolge der erzeugten Doppelstrangbrüche homologe Rekombinationsvorgänge und sorgen damit für genetische Variation [Arber, 2000; Arber, 2003]. Deshalb nutzen Bakterien R-M Systeme zur Regulation der DNA-Aufnahme aus dem Umfeld [Tortosa and Dubnau, 1999].

Im Gegensatz dazu verhindern R-M Systeme die Aufnahme von „Fremd-DNA“ und bewirken damit eine Art genetische Isolation, die zur Erhaltung der genetischen Identität einer Spezies dient. Beispielsweise lassen sich verschiedene bakterielle Zelllinien in eigene Biotypen unterteilen, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen R-M Systeme, die methylierte DNA-Sequenzen erkennen und spalten können, keine Gene untereinander austauschen. Genetische Isolation ist die Voraussetzung dafür, dass eine Spezies seine spezifischen genetischen Charakteristika behält und an eine ökologische Nische anpassen kann, was wiederum die Voraussetzung zur Evolution neuer Spezies bildet. Deshalb sind R-Msysteme von besonderer Wichtigkeit beim Erhalt der Identität einer Spezies und deren evolutionären Spezifizierung [Jeltsch, 2003].

Restriktionsenzyme werden in vier Gruppen unterteilt, die sich in ihren Untereinheiten, dem Bedarf an Kofaktoren und ihren Reaktionsmechanismen unterscheiden. Im Folgenden wird auf Restriktionsenzyme der Gruppe II, die am besten charakterisierten Restriktionsenzyme, eingegangen.

1.2.1 Typ II Restriktionsenzyme

Die Typ II Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen von 4 bis 8 bp Länge und spalten diese innerhalb der Erkennungssequenz oder unmittelbar daneben. Bei der Spaltung werden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden erzeugt. Als allgemeiner Kofaktor fungiert Mg^{2+} , jedoch können auch andere zweiwertige Ionen, wie z.B. Co^{2+} , als Kofaktor

dienen [Baldwin et al., 1999; Bowen and Dupureur, 2003; Vipond et al., 1995]. Typ II Restriktionsenzyme kommen funktionell als Monomer, Dimer oder Tetramer vor und bilden meistens ein eigenes, von ihrer Methyltransferase unabhängiges funktionelles Protein. Die Methyltransferasen hingegen arbeiten als Monomere oder Dimere und übertragen eine Methylgruppe des Donors S-Adenosyl-L-Methionin auf die doppelsträngige DNA, wodurch eine Cytosin-N4-, Cytosin-C5- oder Adenin-N6-Methylierung erzeugt wird.

Die Bedeutung von Typ II Restriktionsenzymen in rekombinanter DNA-Technologie führte dazu, dass mehr als 3500 Typ II Restriktionsenzyme charakterisiert wurden. Sie sind in REBASE, einer Datenbank für Restriktionsenzyme, aufgelistet [Roberts et al., 2003b]. Typ II Restriktionsenzyme spalten nicht nur innerhalb symmetrischer Erkennungssequenzen, sondern, je nach Subtyp, auch außerhalb asymmetrischer Erkennungssequenzen. Durch Lösung ihrer Kristallstrukturen wurde erkannt, dass trotz unterschiedlicher Erkennungssequenz fast alle Typ II Restriktionsendonukleasen im aktiven Zentrum strukturell gleich aufgebaut sind. Dieses besteht aus vier bis fünf β -Faltblatt-Strängen, die von α -Helices flankiert werden. Das aktive Zentrum enthält typischerweise drei konservierte Aminosäurereste, meist Asparaginsäure und Glutaminsäure, sowie Lysin [Aggarwal, 1995; Venclovas et al., 1994], wobei anstelle von Lysin auch Glutamin oder Glutaminsäure vorkommen kann [Lukacs et al., 2000; Newman et al., 1994]. Diese drei Aminosäuren bilden die einzigen typischen Merkmale des ansonsten nur schwach konservierten katalytischen Zentrums, das aber immer im charakteristischen α - β Muster der Sekundär-Strukturelemente vorliegt (Abbildung 1-6).

Die Sequenz des aktiven Zentrums von Typ II Restriktionsenzymen ist aus dem konservierten „PD-(D/E)xK“ – Motiv aufgebaut. (Das Sequenzmuster ist „e-X₁₀₋₃₀-p-D-x₁₀₋₃₀-(D/E)-x-K“, wobei kleine Buchstaben geringe Konservierung und große Buchstaben starke Konservierung bedeuten; x ist jede beliebige Aminosäure.).

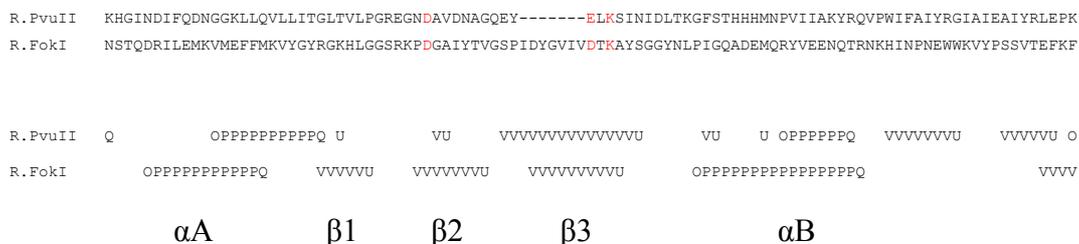


Abbildung 1-6: Sequenzalignment von Typ II Restriktionsendonukleasen. Die konservierten Aminosäuren sind schwarz markiert. Darunter ist das charakteristische α - β Muster der Sekundär-Strukturelemente angegeben (schwarze Balken = konservierte Helices, schwarze Pfeile = konservierte β -Stränge); zwei α -Helices, A und B, flankieren den Kern des zentralen β -Faltblatts; Das PD-(D/E)xK-Motiv ist rot gekennzeichnet.

Dieses gemeinsame Motiv bildet den stabilisierenden Kern vieler Restriktionsenzyme, welcher von unterschiedlichen peripheren Elementen umgeben ist. Die Dimerisierung verläuft nicht nach ähnlichen Mechanismen, dennoch zeigen Typ II Restriktionsenzyme eine äußere Struktur-Homologie, die für gemeinsame biologische Funktionen, z.B. DNA-Bindung, verantwortlich ist. Charakteristisch ist, dass die DNA zwischen die katalytischen Zentren gebunden wird, so dass sie zwischen die zwei Untereinheiten des Enzyms zu liegen kommt. Wenn das Enzym seine spezifische Erkennungsstelle bindet, werden Konformationsänderungen in den Untereinheiten des Enzyms induziert, wodurch die DNA mehr oder weniger vom Protein umschlossen wird.

Weitere Hinweise auf die Verwandtschaft dieser Enzyme sind die typische Anordnung ihrer Gene und deren Vorkommen in einem ähnlichen genetischen Kontext, indem z.B. ähnliche Gene auf einem Chromosom benachbart sind [Kinch and Grishin, 2002; Todd et al., 2001].

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Merkmale werden Typ II Restriktionsenzyme in mehrere Untergruppen unterteilt (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Untergruppen der Typ II Restriktionsenzyme mit spezifischen Charakteristika, Beispiel und Erkennungssequenz; [Jeltsch and Pingoud, 2001; Pingoud et al., 2004; Roberts et al., 2003a]; Zahlen in Klammern geben die Spaltstelle strangaufwärts (positive Zahlen) oder strangabwärts (negative Zahlen) im oberen und unteren Strang an.

| Untergruppe | Charakteristika | Bsp. | Sequenz |
|-------------|---|--------------|---|
| A | asymmetrische Erkennungssequenz | FokI | GGATG (9/13) |
| B | spaltet an beiden Seiten der Erkennungssequenz in beiden Strängen | BcgI | (10/12)CGANNNNNNTGC(12/10) |
| C | symmetrische oder asymmetrische Zielsequenz, R und M in einem Polypeptid | HaeI BcgI | (7/13)GAYNNNNNRTC(14/9) (10/12)CGANNNNNNTGC(12/10) |
| E | 2 Sequenzen: Spalt- & Effektorsequenz | EcoRII | CCWGG(-5/-5) |
| F | 2 Sequenzen werden koordiniert gespalten | SfiI | GGCCNNNNNCCGG(-5/-8) |
| G | symmetrische oder asymmetrische Sequenz, von AdoMet beeinflusst | BsgI | GTGCAG(16/14) |
| H | symmetrische oder asymmetrische Sequenz, ähnliche Genstruktur wie bei TypI RE | BcgI | (10/12)CGANNNNNNTGC(12/10) |
| M | subtyp IIP oder IIA, benötigt methylierte sequenz | DpnI | G m6ATC(-2/-2)) |
| P | symmetrische Sequenz | EcoRI | GAATTC(-5/-5) |
| S | asymmetrische Sequenz | FokI | GGATG(9/13) |
| T | symmetrische oder asymmetrische Sequenz, R Gene sind Heterodimere | Bpu10I | CCTNAGC(-5/-2) |

Diese Untergruppen schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus, so kann ein Enzym die Charakteristika mehrerer Untergruppen zeigen (z.B. BcgI). Einzig wichtig ist, dass Typ II Restriktionsenzyme immer ein spezifisches Spaltnmuster erzeugen.

Verändert man die Spezifität der Restriktionsendonukleasen, so erhält man neue Erkenntnisse über deren Eigenschaften [Jeltsch et al., 1996b]. Basierend auf der Kenntnis von Struktur und funktionellen Eigenschaften von Restriktionsendonukleasen können Varianten dieser Enzyme generiert werden, die eine erweiterte Spezifität aufweisen [Lanio et al., 2000].

1.2.1.1 Restriktionsendonuklease PvuII

Die Typ II-P Restriktionsendonuklease PvuII ist ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten. Das Molekulargewicht jedes Monomers beträgt 18 kDa, so dass das funktionelle PvuII-Dimer mit 36 kDa das kleinste bekannte Restriktionsenzym darstellt. Aus diesem Grund wurde PvuII als ein minimalistisches Modell für Struktur und Funktion von Typ II Restriktionsenzymen untersucht und charakterisiert. Jede Untereinheit trägt ein reaktives Zentrum und ist damit für die Spaltung eines DNA-Stranges des DNA-Doppelstranges verantwortlich. PvuII erkennt die Sequenz CAG↓CTG und spaltet diese in der Mitte, wobei glatte Enden (*blunt ends*) erzeugt werden. Für diesen Reaktionsmechanismus benötigt PvuII Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor. Es werden bis zu zwei Ionen pro Untereinheit gebunden [Conlan and Dupureur, 2002a; Conlan and Dupureur, 2002b; Dupureur and Conlan, 2000; Horton and Cheng, 2000; Jose et al., 1999; Spyridaki et al., 2003], die trotz geringer Änderungen des aktiven Zentrums bewirken, dass strukturelle Änderungen der Tertiärstruktur des gesamten Enzyms auftreten [Dupureur and Dominguez, 2001]. Die Erkenntnis, dass PvuII seine spezifische Erkennungssequenz nur in Anwesenheit des Kofaktors binden kann [Conlan and Dupureur, 2002a; Conlan and Dupureur, 2002b], führte zu der Annahme, dass durch die Bindung des Kofaktors wichtige sequenzspezifische Kontakte hergestellt werden, indem die Metallionenbindung Einfluss auf die Enzymstruktur nimmt.

Beide Mg^{2+} -Ionen sind für die Aktivität von PvuII verantwortlich. Dies ist an der Kooperativität der Metallionenbindung und dem sigmoidalen Verhalten der Spaltgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Ionenkonzentration, mit ermittelten Hill-Koeffizienten von 3.5 und 3.6 [Conlan and Dupureur, 2002a; Conlan and Dupureur, 2002b], zu erkennen. Somit kann ein „Zwei-Metall-Ionen-Mechanismus“ für die Spaltaktivität von PvuII angenommen werden. Das bedeutet, dass zwei Metall-Ionen für die Katalyse benötigt werden, die sich in räumlicher Nähe ($<4\text{\AA}$) zueinander befinden, um den Übergangszustand

der Spaltreaktion zu stabilisieren, indem sie die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Gruppen dieses Zustandes reduzieren [Beese and Steitz, 1991; Cowan, 1998]. Im Falle von PvuII kann man sagen, dass beide Untereinheiten katalytisch aktiv sind und kooperativ arbeiten. Jede Untereinheit wirkt auf einen Strang der doppelsträngigen DNA, so dass beide Stränge innerhalb eines Bindungsereignisses gespalten werden [Pingoud and Jeltsch, 1997].

Die katalytisch wichtigen Aminosäuren von PvuII sind Asp34, Glu68 und Lys 70. So führt z.B. ein Austausch von Asp34 zu Glycin zu einer inaktiven PvuII-Mutante, die aber dennoch die DNA fest binden kann [Nastri et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde die *single-chain* Variante von PvuII (scPvuII) [Simoncsits et al., 2001] verwendet. In dieser Variante wurden die zwei Monomere der homodimeren PvuII miteinander durch einen Linker (Gly-Ser-Gly-Gly) zu einer Polypeptidkette verbunden. Dies wurde möglich, nachdem in der Kristallstruktur sichtbar wurde, dass sich das C-terminale Ende der einen Untereinheit in direkter Nähe zum N-terminalen Ende der anderen Untereinheit befindet [Athanasiadis et al., 1994]. Die scPvuII wurde erzeugt, indem zwei Gene von PvuII tandemartig auf einem Expressionsplasmid hintereinander geschaltet wurden, nur getrennt durch die kurze kodierende Region eines Linkers [Simoncsits et al., 2001]. Das so entworfene funktionelle Enzym stellt ein wichtiges Werkzeug im Protein-Design (*protein engineering*) dar.

1.3 „Protein Engineering“

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen mit hoher Sequenzspezifität und weit verbreitete Werkzeuge in der Molekularbiologie. Für die moderne Genomtechnologie werden jedoch Enzyme mit noch höherer Sequenzspezifität von mindestens 16 bp benötigt, die im optimalen Fall nur eine einzige Erkennungssequenz im zu bearbeiteten Genom aufweisen. In REBASE [Roberts et al., 2003b] sind mehr als 3500 bis heute identifizierte Restriktionsenzyme aufgelistet. Man findet dort jedoch nur 13 Enzyme, deren Erkennungssequenz aus 8 spezifischen Basen besteht. Deshalb ist eine der größten Herausforderungen der Biotechnologie, diese Sequenzspezifität nicht nur zu ändern und zu erweitern.

Bisher wurden verschiedenen Strategien zur Änderung der Erkennung einer gegebenen Sequenz erprobt. Dabei wurden u.a. einzelne Aminosäuren der Restriktionsenzyme zielgerichtet mutiert, wobei die Röntgenstrukturanalyse der Kokristalle der wt-Enzyme mit DNA direkte Hinweise auf die spezifischen Kontakte der Aminosäurereste zu den Basen der DNA lieferten.

Biochemische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass diese Aminosäureaustausche nicht zur gewünschten Änderung der Spezifität führten, sondern lediglich die katalytische Aktivität reduzierten. Grund dafür ist die hohe Redundanz der DNA-Erkennung, weil bei der Translation eines Proteins immer Fehler und damit Einzelmutanten auftreten. Würde das Restriktionsenzym infolge einer Mutation eine andere Sequenz erkennen und spalten, wäre dies für die Zelle tödlich, da die zelleigene DNA nicht mehr durch die zum Restriktionsenzym gehörende Methyltransferase geschützt ist. Deshalb muss sich während der Evolution ein Mechanismus entwickelt haben, der keine unabhängigen Veränderungen von Restriktionsenzym und Methyltransferase erlaubt und der somit verhindert, dass ungeschützte DNA-Sequenzen unkontrolliert gespalten werden.

Aber es gibt auch Beispiele, bei denen ein Aminosäureaustausch zu einer Steigerung der katalytischen Spaltaktivität geführt hat: z.B. die EcoRI I197A Mutante [Ivanenko et al., 1998], BamHI C54A Mutante [Mukhopadhyay and Roy, 1998], HindIII E86K Mutante [Tang et al., 2000]; oder sie hat dazu geführt, dass artifizielle Substrate gespalten werden. So spaltet EcoRV T94V ein modifiziertes artifizielles Substrat (enthält *Sp*-methylphosphonat) vier Größenordnungen schneller als das unmodifizierte [Lanio et al., 1996]. EcoRI Q115A diskriminiert nicht mehr zwischen Thymin und Uracil in der Erkennungssequenz und spaltet GAAUTC sogar schneller als GAATTC [Jeltsch et al., 1993], während der EcoRI-Wildtyp die ursprüngliche Sequenz stark bevorzugt. Aber auch in diesen Fällen wurde keine Änderung der Spezifität erreicht. Ein weiterer Versuch war, die Erkennungssequenz zu erweitern, statt zu verändern. Die Analyse der DNA-Protein-Kokristalle dienten für die Vorhersage, welche Aminosäureaustausche zu den gewünschten Basenkontakten führen sollten. Doch auch hier führten die gerichteten Mutageneseversuche nur zu leichten Spezifitätsänderungen, wie auch am Beispiel der EcoRV Mutante A181E und K104R gezeigt werden konnte [Schottler et al., 1998, Stahl et al., 1998a; Stahl et al., 1998b, Wende et al., 1996] Dabei darf nicht vergessen werden, dass Änderungen in der Aminosäuresequenz automatisch doppelte Auswirkungen zeigen, da sie in jeder Untereinheit eines dimeren Enzymes auftreten. Deshalb ist die Herstellung heterodimerer Enzyme von besonderem Interesse, jedoch auch mit den entsprechenden Schwierigkeiten in z.B der Aufreinigung behaftet [Lacroix et al., 1999; Phipps et al., 1998; Xodo et al., 1994].

Eine weitere Möglichkeit eine Änderung der Sequenzspezifität zu erreichen, ist die zufällige Mutagenese, um Aminosäuren zu finden, die für die Sequenzspezifität eines Restriktionsenzym relevant sind, nicht aber dessen Aktivität beeinflussen. Doch auch hier wurden bisher nur aktive Mutanten gefunden [Rimseliene and Janulaitis, 2001].

Ein neuartiger Ansatz für die Änderung der Sequenzspezifität ist die Herstellung einer chimären Endonuklease, indem die Bindungsdomäne eines Proteins mit der unspezifischen Spaltdomäne eines anderen Proteins fusioniert wird. So wurde z.B. die unspezifische FokI-Spaltdomäne mit drei eukaryotischen Bindungsmotiven verknüpft, dem *helix-turn-helix* Motiv, dem Zinkfinger-Motiv oder dem *helix-loop-helix* Motiv, das einen Leucin-Reißverschluss enthält. Diese chimären Nukleasen spalten sehr spezifisch in der Nähe ihrer erwarteten Spaltstelle. Die vielversprechendsten FokI-Chimären enthalten das Zinkfinger-Motiv als DNA-Bindemotiv, da die Aminosäuresequenz des Zinkfingers die gebundene DNA-Sequenz bestimmt. Bisher gibt es jedoch nur eingeschränkte Möglichkeiten, den Zinkfinger so zu konstruieren, dass die Zielsequenz beliebig variabel und länger als 16 bp lang ist. Dass es ansatzweise möglich ist und dass diese chimären Zinkfinger-Nukleasen sogar einen Doppelstrangbruch und homologe Rekombination an der gewünschten Sequenz erzeugen, konnte kürzlich gezeigt werden

[Bibikova et al., 2001; Bibikova et al., 2002; Carroll, 2004].

1.4 Zielsetzung

Eine der größten Herausforderungen der heutigen Zeit ist es, Krankheiten mittels Gentherapie zu heilen. Dabei ist es das Ziel, genetische Informationen künstlich in Körperzellen einzuschleusen, um dort DNA-Sequenzen auszutauschen, die z.B. Korrekturen mutierter Gene ermöglichen. Vor allem bei monogenetischen Krankheiten würde diese Korrektur zu einer Änderung des Phänotyps führen. Das menschliche Genom enthält 3×10^9 bp, die für ca. 30.000 verschiedene Gene kodieren. Schon eine einfache Mutation kann Änderungen bewirken, die zu Krankheit oder gar frühem Tod führt. Deshalb versucht man in der Gentherapie, genau diese Mutationen gezielt zu adressieren. Das bedeutet aber, dass man spezifisch an dieser Stelle im menschlichen Genom eine Änderung durch, z.B. Herausschneiden, bewirken muss. Als hochspezifische Werkzeuge könnten dafür Restriktionsenzyme eingesetzt werden. Diese Enzyme müssten aber eine Sequenz von mindestens 16 bp erkennen, um nur einmal im menschlichen Genom (je 4^{16} bp = $4,3 \cdot 10^9$ bp) zu schneiden. Die meisten der 3500 bekannten Restriktionsenzyme erkennen aber Sequenzen von nur 4 – 8 bp Länge. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit eine artifizielle Restriktionsendonuklease herzustellen, deren Erkennungssequenz mindestens 16 bp lang und auf verschiedene Zielsequenzen beliebig programmierbar ist. Als Modellenzym wurde die Restriktionsendonuklease PvuII verwendet,

die als *single-chain* Variante (zwei Monomere mit einem Linker zu einer Peptidkette verbunden) exprimiert und aufgereinigt werden kann.

Am Beispiel der Restriktionsendonuklease scPvuII sollten folgende Thesen untersucht werden: (1) Wird dieses Enzym mit einem *triple-helix forming* Oligonukleotid (TFO) gekoppelt, so entsteht ein TFO-scPvuII-Heterokonjugat. (2) In Abwesenheit des Kofaktors von PvuII (Mg^{2+}) bindet dieses Heterokonjugat nur an DNA-Sequenzen, an denen das TFO eine stabile *triple-helix* ausbilden kann. (3) Nach Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} spaltet das Enzym nur solche Sequenzen, die für das Enzym spezifisch sind (CAGCTG für PvuII) und die sich in einem definierten Abstand zur *triple-helix*-Bindungsstelle befinden. (4) Andere PvuII-Spaltstellen ohne *triple-helix*-Bindungsstelle werden nicht gespalten, da das Konstrukt an der adressierten Spaltstelle immobilisiert ist.

Die vorliegende Arbeit hatte somit das konkrete Ziel, die sequenzspezifische Bindung eines beliebigen, jedoch pyrimidinreichen TFOs mit der sequenzspezifischen Spaltung der Restriktionsendonuklease PvuII zu verknüpfen und zu zeigen, dass man damit ein fast beliebig programmierbares Restriktionsenzym konstruieren kann.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Biochemikalien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien haben den Reinheitsgrad *pro analysi* und stammen von der Firma Merck (Darmstadt), falls nicht anders in Tabelle 2-1 angegeben. Zum Ansetzen aller Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, das über ein Seralpur PRO 90 CN-Reinstwassersystem (Seral, Ransbach-Baumbach) gewonnen wurde.

Tabelle 2-1: Chemikalienliste

| Chemikalie | Lieferant |
|-------------------------------------|--|
| 40 %-Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 | AppliChem, Darmstadt |
| 40 %-Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 | AppliChem, Darmstadt |
| Agar | Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe |
| Agarose | Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe |
| Coomassie Brilliant Blue G250, R250 | Serva, Heidelberg |
| DMEM-Medium | Gibco BRL, Karlsruhe |
| DTT | AppliChem, Darmstadt |
| ECL-Reagenz | Amersham Biosciences, Freiburg |
| EGTA | Roche Diagnostics, Mannheim |
| FCS (<i>fetal calf serum</i>) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| GMBS | Pierce, St. Augustin |
| Glycogen | Qiagen, Hilden |
| Ni-NTA-Chelatagarose | Qiagen, Hilden |
| Neomycin-Sulfat | Serva, Heidelberg |
| SDS | Merck, Darmstadt |
| TransFast | Promega, Mannheim |
| Trypsin | Sigma-Aldrich, München |

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer hatten folgende Zusammensetzung:

| | |
|-------|---|
| 5xAAP | 250 mM EDTA, 1,2 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt |
| 1xTPE | 80 mM Tris-Phosphat, 2 mM EDTA, mit H ₃ PO ₄ auf pH 8,3 eingestellt |
| 5xLAP | 190 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 40 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau |
| 1xPBS | 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,3 |
| PDL | 30 mM Kpi, pH 7,2, 0,1 mM DTE, 0,01 % Lubrol |

2.1.2 Radiochemikalien

[γ -³²P]-ATP und [α -³²P]-ATP wurden von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 Restriktionsenzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Restriktionsenzyme von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder NEB (Frankfurt) bezogen. Die Aufreinigung der *single chain* PvuII Variante (scPvuII) erfolgte nach Angaben in Kapitel 2.5.1.

2.1.3.2 Andere Enzyme

T4-Polynukleotidkinase (PNK) und Terminale Transferase wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Auf weitere Bezugsquellen wird an entsprechender Stelle im Text verwiesen.

2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide

2.1.4.1 Primer und Substratoligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden als *primer* für PCR-Reaktionen und als Substrate für die *triple-helix* Bildung verwendet. Fluorophor-markierte Oligonukleotide wurden als

Substrate für Fluoreszenzanisotropie-Messungen verwendet. Diese Oligonukleotide waren HPLC-gereinigt und wurden, falls nicht anders im Text beschrieben, von MWG (Ebersberg/München) bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide werden an entsprechender Stelle im Text genannt. Substrat-Oligonukleotide wurden durch Erhitzen und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur mit ihrem Gegenstrang hybridisiert.

2.1.4.2 TFO

Die in dieser Arbeit verwendeten TFOs sind, bis auf das purinreiche TFO1, pyrimidinreich und bilden demzufolge das Pyrimidinmotif.

Das modifizierte TFO4 trägt die Basenanaloga 5-Methyl-Cytosin (M) statt Cytosin und 5-(1-Propynyl)-Uracil (P) statt Thymin, und wurde von der Firma Eurogentec (Köln) hergestellt. Es wurden vier verschiedene Oligonukleotide hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an eine *triple-helix* Bindungsstelle untersucht: Ein purinreiches 16mer *triple-helix forming* Oligonukleotid (TFO1), ein pyrimidinreiches 16mer *triple-helix forming* Oligonukleotid (TFO2) und ein pyrimidinreiches 16mer *triple-helix forming* Oligonukleotid (TFO4) mit modifizierten Basen und einem (CH₂)₆- bzw. (CH₂)₁₂- Aminolinker am 5'-Ende; als Kontrolle diente ein unspezifisches 16mer TFO3 (siehe Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Die in dieser Arbeit verwendeten TFOs.

| Name | Sequenz |
|------------------------|--|
| Purinreiches TFO1: | 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAA- 3' |
| Pyrimidinreiches TFO2: | 5'-CTCTCTCTTTTTTT- 3' |
| Unspezifisches TFO3: | 5'-GACTGACTGACTGACT- 3' |
| Modifiziertes TFO4 | NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'-MPMPMPMPMPMPPT - 3' |

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (Bio 48, Kendro, Hanau) durchgeführt. Die für diese Arbeit verwendeten Medien, Gefäße, Pipetten und sonstige Materialien wurden vor Benutzung autoklaviert. Mikrobiologische Standardmethoden werden nicht näher beschrieben und können in *Current Protocols in Molecular Biology* [Ausubel et al., 1989] nachgelesen werden.

2.2.1 Plasmide

2.2.1.1 Substratplasmide

pUCD

Das 2720 bp große Plasmid pUCD ist ein Abkömmling von pUC8, trägt eine Ampicillinresistenz und 5 FokI Spaltstellen. pUCD wird so verändert, dass eine zusätzliche FokI Spaltstelle mit flankierender pyrimidinreicher Sequenz zur *triple-helix* Bildung entsteht. Das 150mer PCR-Produkt dieser einklonierten Sequenz liefert das Substrat für den *cleavage protection assay* (siehe Kapitel 2.4.4.1 und Kapitel 2.4.5.1).

pAT153/PvuII

Das pAT153 Plasmid ist ein Derivat des pBR322 Plasmids [Bolivar et al., 1977] bei dem die BOM (*basis of mobility*) Sequenz (wichtig für Plasmidtransfer in andere Bakterien) und eine Sequenz zur Kontrolle der Kopienzahl des Plasmids deletiert wurden. Es trägt eine Ampicillin- und eine Tetracyclin-Resistenz. Das Plasmid pAT153/PvuII ist 3658 bp groß und trägt eine an Position 3656 einklonierte PvuII Spaltstelle. Damit diente das Plasmid als *template* der Substratherstellung für die adressierten Spaltexperimente (siehe Kapitel 2.4.4.2 und 2.4.5.2).

pECFP-ICAD-S(NLS)

Das Ursprungplasmid von pECFP-ICAD-S(NLS) ist der eukaryotische Expressionsvektor pECFP-C1. Wird eine cDNA in die *multiple cloning site* eingefügt und wird das Gen in Säugerzellen exprimiert, so entsteht ein Fusionsprotein mit N-terminal angehängtem ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*). In den pECFP-ICAD-S(NLS) Vektor wurde das ICAD-S Gen (Gregor Meiss, unveröffentlicht) mit der codierenden Sequenz für ein Kernlokalisations-signal (NLS) eingefügt. Dieses NLS ist eine Sequenz, die vom SV40 *large tumor antigen* stammt. Die Kernlokalisierung wird über Phosphorylierungsstellen der Caseinkinase CKII und der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 reguliert [Mahbubani et al., 1997]. Das Plasmid trägt für Anwendungszwecke in eukaryontischen Zellen eine Neomycin-Resistenz und den SV40-Promotor, und für Anwendungen in prokaryontischen Zellen eine Kanamycin-Resistenz und pUC-Promotor.

Da dieses Plasmid vier PvuII-Spaltstellen (Positionen 442, 1312, 1920 und 5548) trägt, eignet es sich besonders gut als Substrat für Experimente zur adressierten Spaltung. Dafür wird eine

zusätzliche PvuII-Schnittstelle an Position 2833 und eine *triple-helix* Bindungsstelle neun Basen *upstream* davon eingefügt. (siehe Kapitel 2.4.5.3)

pPl_2_triple

Das Ursprungsplasmid pPl_2 ist ein *low-copy-number* Plasmid von 6123 bp Länge, das selbständig in *E.coli* repliziert und in das Genom von *Listeria monocytogenes* integriert wird. Hergestellt wurde pPl_2 von P. Lauer aus 6 unabhängigen DNA-Quellen [Lauer et al., 2002]. Das Plasmid pPl_2 trägt den RP4 *ori of transfer* (*oriT*), um von *E.coli* direkt zu *L.monocytogenes* transferiert werden zu können. Das Listeriophage U153 Integrasegen ermöglicht die spezifische Integration des Plasmids ins Listerien-Genom an der *attPP'*-Stelle. Für die Expression des U153 Integrasegens trägt das Plasmid den p60 Promotor. Zur Selektion in *E.coli* trägt das Plasmid das Gm- CAT Gen und zur Selektion in den Listerien das Gm+ CAT Gen. Das dieses Plasmid 3 PvuII-Schnittstellen trägt (Positionen 858, 1270 und 4686), wird an Position 987 eine adressierte PvuII-Schnittstelle mit 9 bp entfernter *triple-helix* Bindungsstelle eingefügt.

2.2.1.2 Expressionsplasmide

pRIZ'-scPvuII

Das Expressionssystem pRIZ'-scPvuII wurde von A. Simoncsits (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB)) generiert [Simoncsits et al., 2001]. An das Tandemgen zur Generierung der *single-chain* PvuII Variante wurde C-terminal ein His₆-tag, ein Glycin-*linker* (bestehend aus 4 Glycinen) und ein terminals Cystein durch PCR-gerichtete Mutagenese [Kirsch and Joly, 1998] angefügt. Dafür wurde folgende Primer verwendet:

Tabelle 2-3: Primer zur Herstellung eines C-terminalen Endes an *single-chain* PvuII bestehend aus vier Glycinen und endständigem Cystein

| Primer | Sequenz |
|------------|--|
| H6G4C_Rück | 5'-CATCATCACCACGGAGGAGGCGGCTGCTAAGCTTGCTTCTTT-3' |
| H6G4C_Hin | 5'-TACGGATCCGGAGGAAGTCACCCAGATCTAAATAAATTATTA-3' |

Das pRIZ'-scPvuII Plasmid trägt eine Ampicillinresistenz.

pECFP-scPvuII-NLS(+) bzw. pECFP-scPvuII-NLS(-) / pECFP-wtPvuII-NLS(+) bzw. pECFP-wtPvuII-NLS(-)

Ursprungsplasmid dieser vier eukaryontischen Expressionsplasmide ist der pECFP-ICAD-S(NLS) Vektor (siehe 2.2.1.1). Aus diesem Plasmid wurde das ICAD-S-Gen ohne NLS oder mit NLS durch Restriktionsverdau entfernt. In diesen Plasmidrahmen wurde nun das Gen für scPvuII hineinkloniert, so dass zwei unterschiedliche eukaryontische Expressionsplasmide generiert wurden. Das Plasmid pECFP-scPvuII-NLS(+) exprimiert ECFP mit C-terminal angefügter scPvuII mit NLS, während pECFP-scPvuII-NLS(-) das ECFP-Protein mit C-terminal angefügter scPvuII ohne NLS exprimiert. Diese beiden Varianten wurden auch mit dem Wildtyp-PvuII-Gen hergestellt und ergaben folgende Plasmide: pECFP-wtPvuII-NLS(+) bzw. pECFP-wtPvuII-NLS(-).

Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmiden sowie zur Proteinexpression wurden Bakterien der Art *E.coli* verwendet. Die verschiedenen Zelllinien stammen alle vom Sicherheitstamm K12 ab. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

XL1-blue MRF'

Genotyp: $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrBC-hsdSMR-mmr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F' *proAB lacI^qZ* Δ 15 Tn5 (Tet^r)]

Diese Zellen sind *endA* defizient, was die Qualität von Miniprep-DNA verbessert, ein blau/weiß *screening* und die Isolierung von einzelsträngiger *phagemid* DNA ermöglicht.

Außerdem sind sie defizient für alle bekannten *E.coli* K12 Restriktionsenzyme, so dass man in diesen Zellen beliebige DNA klonieren kann.

JM109

Genotyp: *gyr96A*, *recA1*, *relA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^-), *endA1*, *thi*, $\Delta[lac, proAB]$, *supE44*, [F'], *traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ 15

Beide *E.coli* Zelllinien sind recombinationsdefizient. Sie haben die Fähigkeit zur homologen Rekombination verloren, da ihr RecA1 Gen eine Mutation trägt. Deshalb sind sie resistent

gegen Plasmid-Umstrukturierungen, Integration episomaler Gene oder Verlust von Genabschnitten. Während meiner Arbeit hat sich herausgestellt, dass in der JM109 Zelllinie in dem hoch mutagenen pRIZ'-scPvuII Plasmid wesentlich weniger Mutationen entstehen als in der XL1-blue MRF' Zelllinie. Deshalb wurde JM109 nicht nur für die Proteinexpression von scPvuII, sondern auch für sämtliche Klonierungen verwendet.

Die verwendeten Zelllinien sind *mcrBC* defizient, um die Spaltung methylierter DNA zu verhindern.

2.3 Zellbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank (Faster BH 48, Kendro, Hanau) durchgeführt. Alle für diese Arbeiten verwendeten Pipetten und sonstigen Materialien wurden vor Benutzung autoklaviert. Zellkulturflaschen und Zellkulturmedien wurden steril geliefert.

2.3.1 Kernlokalisierungsexperimente

In diesem Experiment wurde die Lokalisation von ECFP-PvuII-Fusionsproteinvarianten mit und ohne Kernlokalisierungssignal (NLS) in eukaryontischen (Säuger-) Zellen mittels Konfokal-Laser-Scan-Mikroskopie untersucht. Dafür wurde die Restriktionsendonuklease PvuII als Wildtyp-Variante und als *single-chain* Variante mit ECFP fusioniert, indem im pECFP-ICAD-S(NLS) Ursprungsvector das ICAD-S-Gen und ICAD-S(NLS)-Gen durch das Gen für wildtyp-PvuII oder *single-chain*-PvuII ersetzt wurde (siehe Kapitel 2.2.1.1. und Kapitel 2.2.1.2.). Die daraus resultierenden eukaryontischen Expressionsplasmide wurden anschließend in Säugierzellen transfiziert.

2.3.1.1 Zellkultur

Für die Kernlokalisierungsexperimente wurden zwei Säugerezelllinien verwendet:

Tabelle 2-4: Eukaryontische Säugerzelllinien für Kernlokalisationsexperimente

| Zelllinie | Eigenschaften |
|--------------|---|
| HeLa (CCL-2) | humane Epithelzelllinie, isoliert aus Zervix-Adenocarcinom; adherent |
| HEK293T | humane embryonale Nierenzelllinie, die mit fragmentierter DNA eines Adenovirus Typ5 transformiert wurde; Überexpression des SV40 T Antigens; adherent |

Die Zelllinien wurden in DMEM-Medium mit 1 % FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Bilden die Zellen einen konfluenten Monolayer, werden sie mit 12 ml 1 × PBS gewaschen, durch Trypsin-Behandlung (2,5 ml Trypsin (0,25%, Sigma Aldrich, München) je 20 cm Schale) vom Boden der Gewebekulturschale gelöst und in frischem Medium aufgenommen. Durch mehrmaliges Resuspendieren werden noch zusammenhängende Zellen voneinander getrennt. Die Zellsuspension wird auf die gewünschte Zellzahl ($5,5 \times 10^5$ Zellen pro 60 mm Kulturschale) verdünnt und in neue Gewebekulturschalen überführt, so dass die Zelldichte am Tag der Transfektion ca. 80 % beträgt.

2.3.1.2 Transfektion

Um Plasmid-DNA in Säuger-Zellen zu transfizieren, wurde TransFast von Promega (Mannheim) verwendet. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, verwendet man DNA mit einem hohen Anteil an *supercoil* DNA. Dafür wurde die DNA über MaxiPrep Säulen nach QIAprep Maxiprep-Protokoll aufgereinigt.

Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers: 15 µg DNA pro Gewebekulturschale (d=100 mm), wurden mit 6 ml auf 37 °C vorgewärmtem Medium (ohne Zugaben von Serum, Proteinen oder Antibiotika) und TransFast-Reagenz (3 µl auf 1 µg DNA) vermischt und für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Mediums von den Zellen wurde die DNA/TransFast-Mischung kurz „gevortext“ und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zelle 1 Stunde im Inkubator inkubiert und anschließend mit 12 ml des kompletten Mediums (mit Serum und mit Antibiotika) überschichtet. Nun wurden die Zellen für mindestens 24 h im Inkubator inkubiert.

2.3.1.3 Mikroskopie

Die Lokalisation der unterschiedlichen in HeLa-Zellen exprimierten ECFP-Fusionsproteine wurde mittels Konfokal-Laser-Scan-Mikroskopie analysiert. Dafür wurden die Zellen mit einem Leica TCS4D Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Leica, Wetzlar) durch ein Leica APO L40×/0,80 W U-V-1 Objektiv untersucht. Die Anregung des ECFP-Proteins erfolgte bei 488 nm mit einem 75 mW Omnicrome Argon / Krypton Laser. Die Emission wurde unter Verwendung eines 580 nm-Licht-Aufteilers und eines 510 nm *longpass*-Filters detektiert.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1 Analyse von DNA-Fragmenten

2.4.1.1 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine wichtige Methode zur Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten, zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsspaltungen, sowie zur Auswertung von Aktivitätstests und Spaltkinetiken mit Plasmid-DNA. Die Auftrennung doppelsträngiger DNA ist in einem Molekularbereich von 200 bis 50 000 bp möglich, je nach Wahl der Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 4 % (w/v). Die Agarose wurde für diesen Zweck in 1 × TPE aufgelöst. Die DNA-haltigen Proben wurden mit 0,2 Volumen 5 × AAP aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem Video-Dokumentationssystem (INTAS, Göttingen), nachdem das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,1 µg/ml) gefärbt wurde.

2.4.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Makromolekülen, wie z.B. Nukleinsäuren, nach ihrer Größe, wobei der Molekularsiebeffekt ausgenutzt wird. Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und Vernetzung der linearen Polymere durch N, N'-Methylenbisacrylamid, wobei der Vernetzungsgrad variiert und damit die „Maschenweite“ des Gels auf die Größe der zu trennenden Makromoleküle angepasst werden kann. Dabei bestimmt die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz die Länge der Polyacrylamidketten, das Verhältnis der Acrylamidkonzentration zur Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Der in dieser Arbeit verwendete Vernetzungsgrad betrug (29:1). Die Acrylamidgel-Stammlösung (40 %) wurde in 1 × TPE auf 6 % oder 12 %

verdünnt. Die Polymerisation wurde durch Ammoniumpersulfat (APS, 0,8 % (w/v)) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, 0,2 % (w/v)) initiiert. Die DNA-haltigen Proben wurden mit 0,3 Volumen 5 × AAP auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 × TPE verwendet.

Nach Färbung in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) erfolgte die Dokumentation mit einem Video-Dokumentationssystem (INTAS, Göttingen).

2.4.3 „*electrophoretic mobility shift assay*“ (EMSA)

Mit dem *electrophoretic mobility shift assay* untersucht man die Bindung von Molekülen an DNA-Substrate durch Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.2). Dabei können diese Moleküle unterschiedlicher Natur sein, z.B. Protein oder DNA. Einzige Voraussetzung ist, dass die Dissoziation des Komplexes langsamer als die Assoziation ist, so dass der Komplex mit Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Deshalb lässt man diese Gele bei geringer Stromstärke laufen, um unnötige Erwärmung des Gels zu verhindern und somit den Komplex nicht zu zerstören (hier 12 mA/20 cm). Das DNA-Substrat wurde mit PNK am 5'-Ende radioaktiv markiert, um seine Wanderungsgeschwindigkeit im Gel verfolgen zu können. Bindet ein anderes Molekül an die DNA, wird die Laufgeschwindigkeit des gebundenen DNA-Substrates verringert, was im Gel nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Titriert man eine definierte Substratmenge mit unterschiedlichen Mengen des zu untersuchenden Moleküls, so kann daraus die Assoziationskonstante des Moleküls berechnet werden. Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wurden 12 %ige Polyacrylamidgele in 1 × TP (80 mM Tris-Phosphat, mit H₃PO₄ auf pH 7,2 eingestellt) verwendet, deren Verhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 beträgt. Die DNA-haltigen Proben wurden mit 5 × SAP (= Saccharoseauftragspuffer, 50 % (v/v) Saccharose, 1 × TP, pH 7,2) auf das Gel aufgetragen, nachdem das Gel 30 min vorgelaufen war. Die Quantifizierung erfolgte im Instant-Imager (Packard).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung eines *triple-helix forming* Oligonukleotids (TFO) an ein doppelsträngiges DNA-Substrat untersucht (siehe auch Kapitel 2.4.8.2)

2.4.4 Substratherstellung mit Hilfe der PCR

DNA-Substrate wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt, indem bestimmte DNA-Abschnitte von den jeweiligen Plasmiden amplifiziert wurden. Dazu

verwendet man die thermostabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bzw. Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* und die entsprechenden Hin- und Rück-*primer*. Die Reaktion wurde in einem Landgraf-Thermocycler (Langenhagen) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden 50 µl Reaktionsgemische angesetzt, bestehend aus: 1 U Taq-Polymerase bzw. Pfu-Polymerase, jeweils 400 nM Hin- und Rück-*primer*, 200 µM dNTP's, 10 ng *template* (Plasmid mittels „QIAprep Miniprep Kits“ gewonnen), Polymerase-Puffer. Das Temperaturprofil wurde entsprechend der Anwendung variiert, besteht aber im allgemeinen aus drei sich bis zu 30-mal wiederholenden Teilreaktionen:

- Denaturierung des *template* bei 95 °C
- Hybridisierung (*annealing*) der *primer* auf den komplementären Sequenzen des *template* (Hybridisierungstemperatur wird bei den entsprechenden Primern gesondert angegeben)
- DNA-Synthese durch Verlängerung der *primer*, indem Nukleotide angehängt werden, am Temperaturoptimum der Taq-Polymerase bzw. Pfu-Polymerase bei 72 °C bzw. 68°C

Das Temperaturprofil der einzelnen Anwendungen wird an entsprechender Stelle genau angegeben.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert und für weitere Anwendungen aufgereinigt. Dabei wurden dNTP's, *primer*, und die Taq-Polymerase vom PCR-Produkt mittels „QIAquickspin PCR Purification Kit“ abgetrennt.

2.4.4.1 Substratgewinnung für „*cleavage protection assay*“

Zur Substratgewinnung für den „*cleavage protection assay*“ wurde zunächst in das Plasmid pUCD eine FokI-Spaltstelle mit benachbarter pyrimidinreichen Sequenz zur *triple-helix* Bildung eingefügt und damit das Plasmid pUCDmuttriple-FokI erzeugt (siehe auch Kapitel 2.4.4.2). Das Plasmid pUCDmuttriple-FokI diente dann als *template* zur Generierung eines 174 bp PCR-Produktes, welches beide eingefügten Sequenzen (FokI- und *triple-helix* Bindungsstelle) enthält.

Dafür wurden folgende *primer* verwendet:

Tabelle 2-5: Primer zur Substratherstellung für den „*cleavage protection assay*“

| Primer | Sequenz |
|---------------------|--|
| P _{gegen2} | 5'-GTGGATAACCGTATTACCGCCTTT-3' |
| P _{mutfok} | 5'-CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCGGATGCATT-3' |

Für die PCR wurde die Taq-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet:

1 × 2 min, 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 56 °C, 20 sec 72 °C); 1 × 40 sec 72 °C. Anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und die Konzentration photometrisch (OD₂₆₀) bestimmt.

„*cleavage protection assay*“

Die Ausbildung einer *triple-helix* wurde mit einem *cleavage protection assay* untersucht, bei dem eine FokI-Spaltstelle durch die *triple-helix* geschützt wurde. Dabei wurde die besondere Eigenschaft von FokI zu Nutze gemacht, dass FokI sein Substrat neben seiner Bindungsstelle, 9 Basen im oberen und 13 Basen im unteren Strang *downstream*, spaltet. Durch die Ausbildung einer *triple-helix* kann FokI damit sein Substrat zwar noch binden, aber nicht mehr spalten. (siehe Kapitel 2.4.8.3)

2.4.4.2 Substratherstellung für „*directed cleavage assay*“

Das nicht-adressierte normale 478 bp Spaltsubstrat (mit PvuII Spaltstelle aber ohne *triple-helix* Bindungsstelle) wurde mittels PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase und pAT153/PvuII als *template* hergestellt. Das Temperaturprofil war: 1 × 2 min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 56 °C, 30 sec 72 °C); 60 sec 72 °C. Anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt und das PCR-Produkt aufgereinigt.

Es wurden folgende *primer* verwendet:

Tabelle 2-6: Primer zur Herstellung des nicht-adressierten normalen Substrates für „*directed cleavage assay*“

| Primer | Sequenz |
|----------------------------|----------------------------------|
| P _{Prom} | 5'- AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' |
| P _{lindiff3'kurz} | 5'- ATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTG-3' |

Dieses PCR-Produkt wurde als nicht-adressiertes Substrat (mit PvuII Spaltstelle, aber ohne *triple-helix* Bindungsstelle) in Einzelspaltkinetiken und Konkurrenzspaltkinetiken getestet (siehe Kapitel 2.6.1).

2.4.5 Mutagenese-PCR

Die Substratherstellung durch zielgerichtete Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte nach der Methode von Kirsch & Joly (1998). Hier wird durch die Verwendung eines PCR-primers eine gewünschte Mutation in ein Plasmid eingefügt. Zusätzlich wird durch eine stille Mutation eine Markerschnittstelle für ein Restriktionsenzym eingeführt, so dass durch Spaltung der Markerschnittstelle die erfolgreiche Mutagenese nachgewiesen werden kann.

Diese Mutagenese-PCR erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird ein 200 bp bis 700 bp langes PCR-Produkt, der sogenannte *Megaprimer*, mit Pfu-Polymerase amplifiziert. Dieser *Megaprimer* dient im zweiten Schritt als *primer* in der *rolling circle PCR*, in der der gesamte Vektor amplifiziert wird. Das entstehende Produkt trägt nun die gewünschte und die stille Mutation in beiden DNA-Strängen. Außerdem liegt das Produkt in zirkulärer Form vor, da seine Enden, die den verwendeten *Megaprimern* entsprechen, komplementär zueinander sind [Jeltsch and Lanio, 2002]. Dieses Produkt kann man zur Vervielfältigung in *E.coli* transformieren. Dafür ist es wichtig, dass die *template* Plasmide von den PCR-Produkten abgetrennt werden. Dies wird durch einen vollständigen Verdau mit R.DpnI erreicht. R.DpnI aus *Streptococcus pneumoniae* spaltet methylierte G^mATC-Sequenzen, die auf Plasmiden aus *dam*⁺-*E.coli*-Zellen vorkommen, also auch nicht abgetrennte wt-Plasmide, nicht aber unmethylierte PCR-Produkte.

2.4.5.1 Mutagenese-PCR für „cleavage protection assay“

Zur Substratherstellung für den „*cleavage protection assay*“ wurde zunächst das Plasmid pUCDmuttriple-FokI hergestellt. Dazu wurde in einer ersten Mutagenese-PCR in das pUCD Plasmid eine pyrimidinreiche Sequenz eingefügt, die mit dem modifizierten TFO5 eine *triple-helix* ausbilden konnte. In einer zweiten Mutagenese-PCR wurde eine zusätzliche FokI Bindungsstelle eingefügt, die 6 bp in 3'-Richtung von der *triple-helix* Bindungsstelle entfernt ist. Damit befindet sich die FokI-Spaltstelle genau im *triple-helix* Bindungsbereich. Diese Spaltung wird durch Ausbildung einer *triple-helix* verhindert.

Tabelle 2-7: Primer für Mutagenese-PCR zur Herstellung des Plasmides pUCDmuttriple-FokI aus pUCD; Hin-*primer* sind P_{pUCDmuttriple} (führt *triple-helix* Bindungsstelle ein, unterstrichen) und P_{mutFokI} (entfernt PvuII-Spaltstelle und führt FokI-Spaltstelle ein, unterstrichen); Gegen-*primer* ist P_{gegen2}

| Primer | Sequenz |
|----------------------------|--|
| P _{pUCDmuttriple} | 5'-GCCAGCTGCATTTT <u>GAGAGAGAGAAAAAACGGGGAGAGGCG</u> -3' |
| P _{mutFokI} | 5'- CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC <u>GGATGCATT</u> -3' |
| P _{gegen2} | 5'- GTGGATAACCGTATTACCGCCTTT-3' |

Das folgende Temperaturprofil wurde zur Herstellung der *megaprimer* benutzt:

1 × 2 min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 56 °C, 20 sec 68 °C); 40 sec 68 °C; Abkühlen auf 4 °C

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und als *megaprimer* in einer *rolling circle* PCR nach folgendem Profil eingesetzt:

1 × 2 min 95 °C; 20 × (30 sec 95 °C, 900 sec 68 °C); Abkühlen auf 4 °C

Hier erfolgte die Hybridisierung zwischen *primer* und *template* sowie auch die Synthese der DNA-Stränge bei 68 °C. Die PCR-Produkte wurden über Nacht mit R.DpnI bei 37 °C im PCR-Ansatz verdaut, mit Ethanol gefällt und in Wasser aufgenommen. Mit dieser DNA wurden *E.coli* JM109-Zellen transformiert.

2.4.5.2 Mutagenese-PCR für adressierte Spaltung auf PCR-Substraten

Für die adressierte Spaltung wurden sechs verschiedene Substrate von 239 bp Länge hergestellt. Alle Substrate haben nahezu die gleiche Sequenz und tragen eine PvuII Spaltstelle an Position 206 sowie eine pyrimidinreiche Sequenz zur Ausbildung einer *triple-helix*. Der einzige Unterschied besteht im unterschiedlichen Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle. Als *template* wurde pAT153/PvuII und folgende Rück-*primer* (*triple-helix* Bindungsstelle im Fettdruck) verwendet:

Tabelle 2-8: Primer P_{BglIII} ist der Hin-*primer* (BglIII-Markerstelle unterstrichen); alle anderen primer P_{triple} sind Rück-*primer*, deren *triple-helix* Bindungsstelle fett gedruckt ist und deren Nummer den Abstand dieser *triple-helix* Bindungsstelle zur PvuII-Spaltstelle in 3'-Richtung kennzeichnet

| Primer | Sequenz |
|-----------------------|--|
| P _{triple3} | 5' - CGGTACTCGACGTTTTTTTCTCTCTCTCAGA-3' |
| P _{triple5} | 5' - CGGTACTCGATTTTTTTCTCTCTCTCGCAGA-3' |
| P _{triple7} | 5' - CGGTACTCTTTTTTTCTCTCTCTCCAGCAGA-3' |
| P _{triple9} | 5' - CGGTACTTTTTTTCTCTCTCTCCACAGCAGA-3' |
| P _{triple11} | 5' - CGGTTTTTTTTCTCTCTCTCCGCACAGCAGA-3' |
| P _{triple13} | 5' - CGTTTTTTTTCTCTCTCTCGGCGCACAGCAGA-3' |
| P _{BglIII} | 5' - GGCCTCTTGCGGGAGATCTTCCATTCCGAC-3' |

Folgendes Temperaturprofil wurde für die Substrate mit Abstand 3 bp, 5 bp, 9 bp, 13 bp zwischen PvuII Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle angewendet:

1 × 2 min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 50 °C, 20 sec 68 °C); 40 sec 68 °C; Abkühlen auf 4 °C

Folgendes Temperaturprofil wurde für die Substrate mit Abstand 7 bp und 11 bp zwischen PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle angewendet:

1 × 2min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 55 °C, 20 sec 68 °C); 40 sec 68 °C; Abkühlen auf 4 °C

Alle PCR-Produkte wurden aufgereinigt und deren Konzentration photometrisch (OD_{260nm}) bestimmt. Die Reinheit der PCR-Produkte wurden auf einem Polyacrylamid-Gel überprüft (siehe Kapitel 2.4.2).

2.4.5.3 Mutagenese-PCR für adressierte Spaltung auf Plasmidsubstrat: pECFP-ICAD-S(NLS)+PvuII

Das pECFP-ICAD-S(NLS) Plasmid trägt vier PvuII-Spaltstellen. Zur Herstellung des Substratplasmides für die adressierten Spaltexperimente wurde eine zusätzliche PvuII-Spaltstelle an Position 2868 eingefügt. Zusätzlich wurde 9 Basen entfernt davon eine *triple-helix* Bindungsstelle eingefügt. Beide Mutationen wurden durch Mutagenese-PCR erhalten, wofür folgende *primer* zur Generierung der *megaprimer* benutzt wurden:

Tabelle 2-9: *Primer* für Mutagenese-PCR zur Herstellung eines Plasmidsubstrates für adressierte Spaltexperimente, primer P_{pECFP_triplemut} führt eine *triple-helix* Bindungsstelle (fett) und eine PvuII-Spaltstelle ein (unterstrichen)

| Primer | Sequenz |
|------------------------------|--|
| P _{pECFP_triplemut} | 5'-CGCGTTTTTTTCTCTCTCACCCCACCCAGCTGTTTCGG- GTGAAGGCC-3' |
| P _{pECFP_rück} | 5'-GCAGCAGATTACGCGCAGAAAA-3' |

Für die Erzeugung der *megaprimer* wurde folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 × 2 min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 30 sec 59 °C, 20 sec 68 °C); 40 sec 68 °C; Abkühlen auf 4 °C

Die *megaprimer* wurden mit einem „QIAprep PCR Purification Kit“ aufgereinigt und als *primer* in eine *rolling circle* PCR mit folgendem Temperaturprofil eingesetzt: 1 × 2 min 95 °C; 20 × (30 sec 95 °C, 900 sec 68 °C); Abkühlen auf 4 °C

Das nun zirkuläre PCR-Produkt wurde über Nacht mit 2 U R.DpnI im PCR-Ansatz verdaut, anschließend mit Ethanol gefällt, in Wasser aufgenommen. Mit dem Plasmid wurden JM109 Zellen transformiert. Das *screening* nach positiven Klonen erfolgte, indem die Plasmide mit Hilfe eines „QIAprep Miniprep Kits“ wieder aus den transformierten Zellenklonen isoliert wurden und mit PvuII gespalten wurden. Plasmide mit eingefügter PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle zeigten nach PvuII-Verdau fünf DNA-Fragmente (2715 bp, 950 bp, 870 bp, 608 bp und 450 bp) während das Ursprungsplasmid nur vier DNA-Fragmente (3665 bp, 870 bp, 608 bp und 450 bp) bildete. Dieses Plasmid konnte nun in adressierte Spaltexperimente eingesetzt werden.

2.4.5.4 Mutagenese-PCR für adressierte Spaltung auf Plasmidsubstrat pPI_2 in Kompetition mit genomischer (λ -DNA) DNA

Das pECFP-ICAD-S(NLS) Plasmid trägt vier PvuII-Spaltstellen. Zur Herstellung des Substratplasmides für die adressierten Spaltexperimente wurde eine zusätzliche PvuII-Spaltstelle an Position 2868 eingefügt. Zusätzlich wurde 9 Basen entfernt davon eine *triple-helix* Bindungsstelle eingefügt. Beide Mutationen wurden mittels Mutagenese-PCR erhalten, wofür folgende *primer* zur Generierung der *megaprimer* benutzt wurden:

Tabelle 2-10 **Tabelle:** *Primer* für Mutagenese-PCR zur Herstellung eines Plasmidsubstrates für adressierte Spaltexperimente, primer P_{pPl_2_triplemut2} führt eine *triple-helix* Bindungsstelle (fett) und eine PvuII-Spaltstelle ein (unterstrichen)

| Primer | Sequenz |
|-----------------------------------|--|
| P _{pPl_2_triplemut2} | 5'- ATTTTTTCTCTCTCTCCATTTCCCTT <u>CAGCTGTGAAAATCTCGATAACTC</u> -3' |
| P _{pPl_2_triplemutrück2} | 5'- CCCCCTCAGTAGCTGAACAGGAGGG-3' |

Für die Erzeugung der *megaprimer* wurde folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 × 2 min 95 °C; 30 × (30 sec 95 °C, 45 sec 64 °C, 20 sec 68 °C); 40 sec 68 °C; Abkühlen auf 4 °C

Die *megaprimer* wurden mit einem „QIAprep PCR Purification Kit“ aufgereinigt und als *primer* in eine *rolling circle* PCR mit folgendem Temperaturprofil eingesetzt: 1 × 2 min 95 °C; 20 × (30 sec 95 °C, 900 sec 68 °C); Abkühlen auf 4 °C

Das nun zirkuläre PCR-Produkt wurde über Nacht mit 2 U R.DpnI im PCR-Ansatz verdaut, anschließend mit Ethanol gefällt und in Wasser aufgenommen. Mit dem Plasmid wurden JM109 Zellen transformiert. Das *screening* nach positiven Klonen erfolgte, indem die Plasmide mit Hilfe eines „QIAprep Miniprep Kits“ wieder aus den transformierten Klonen isoliert und mit PvuII gespalten wurden. Plasmide mit eingefügter PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle ergaben nach PvuII-Verdau vier DNA-Fragmente (129 bp, 283 bp, 3416 bp, 2295 bp), während das Ursprungsplasmid nur drei DNA-Fragmente (412 bp, 3416 bp, 2295 bp) bildet.

2.4.6 ³²P-Markierung

Eine radioaktive Markierung von DNA-Substraten ist immer dann erforderlich, wenn geringe Mengen DNA detektiert und quantifiziert werden müssen. Dies ist zum Beispiel in Gel-retardationsexperimenten oder bei Spaltexperimenten mit adressierter Spaltung der Fall. Dabei erfolgt die radioaktive Markierung mit dem Nuklid ³²P entweder am Ende eines DNA-Stranges (siehe Kapitel 2.4.6.1) oder im gesamten DNA-Strang (siehe Kapitel 2.4.6.2). Diese radioaktiven Proben werden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt, indem die Polyacrylamidgele im Instant Imager (Packard) ausgezählt werden. Anschließend können die *counts per minute* (cpm) ausgewertet werden.

2.4.6.1 Substratherstellung für „electrophoretic mobility shift assay“

Die radioaktive Markierung am 5'-Ende eines DNA-Stranges erfolgte mit der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK). In einem Ansatz wurden 10 μ M Oligonukleotid mit 1 U PNK, 2 μ l [γ - 32 ATP] (1 μ Ci/ μ l bzw. 37 MBq/ml) und PNK-Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PNK durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Da die Markierung nur an einem Strang erfolgte, musste dieser anschließend mit seinem Gegenstrang hybridisiert werden, um das doppelsträngige Substrat zu bilden. Dafür wurden äquimolare Mengen eines komplementären Oligonukleotides für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Aufreinigung über ein „QIAprep Nukleotide Removal Kit“ wurde die Konzentration photometrisch ($OD_{260\text{nm}}$) bestimmt. Das radioaktiv markierte Substrat wurde nun im *electrophoretic mobility shift assay* zur Quantifizierung der *triple-helix* Bildung eingesetzt (siehe Kapitel 2.4.6.2).

2.4.6.2 Substratherstellung mit interner 32 P-Markierung für die adressierte Spaltung

Die interne radioaktive Markierung erfolgte, indem 1 μ l [α - 32 P]ATP (10 μ Ci/ μ l bzw. 370 MBq/ml, Hartmann, Braunschweig) in einem 50 μ l PCR-Ansatz zur Substratherstellung eingesetzt wurde. Dabei werden die markierten α -Phosphatgruppen der Nukleotidtriphosphate (dNTPs) in den neu synthetisierten Strang eingebaut. Die Herstellung des nicht-adressierten Substrates ohne *triple-helix* Bindungsstelle erfolgte mit Taq-Polymerase (siehe Kapitel 2.4.4.2). Die Herstellung des adressierten Substrates erfolgte mit Pfu-Polymerase, um mit den jeweiligen *primern* eine *triple-helix* Bindungsstelle in verschiedenen Abständen zur PvuII Spaltstelle einzufügen (siehe Kapitel 2.4.5.2). Diese Substrate wurden mit einem „QIAprep PCRprep Kit“ aufgereinigt und die Konzentration photometrisch ($OD_{260\text{ nm}}$) bestimmt. Die Reinheit der PCR-Produkte wurde auf einem Polyacrylamid-Gel überprüft. Dann wurden die Substrate entweder in Einzelspaltungsexperimenten oder in Konkurrenzexperimenten eingesetzt (siehe Kapitel 2.6.1).

2.4.7 TFO-scPvuII Herstellung: Kopplungsreaktion

Für die adressierte Spaltung wurde eine scPvuII-TFO-Chimäre hergestellt, die aus einem Proteinteil (scPvuII) und einem Oligonukleotidteil (TFO) besteht. Beide Teile sind über einen Linker definierter Länge miteinander verbunden. Es wurden zwei Linker unterschiedlicher

Länge, $(\text{CH}_2)_6$ (6 Methylengruppen) und $(\text{CH}_2)_{12}$ (12 Methylengruppen) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spaltpräferenz untersucht. Diese Linker tragen eine Aminogruppe und sind am 5'-Ende mit dem TFO verbunden. Die Kopplung zwischen scPvuII und $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-TFO}$ bzw. $\text{NH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-TFO}$ erfolgte mit Hilfe eines bifunktionalen Crosslinkers (GMBS = N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester) in zwei Einzelreaktionen:

Zuerst erfolgte ein Crosslink zwischen $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-TFO}$ und GMBS. Hier reagiert die Aminogruppe am Linker des TFOs mit der Carboxylatgruppe des GMBS unter Bildung einer Amidbindung. Es wurden 4 mM GMBS mit 80 μM TFO in $1 \times \text{PBS}$ für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes GMBS über zwei Gelchromatographiesäulen-Säulen (NAP5 und NAP10) entfernt. Das Eluat wurde über Nacht in der Speedvac getrocknet und das Pellet anschließend in $1 \times \text{PBS}$ aufgenommen.

In der zweiten Reaktion wurde das Protein an das GMBS-TFO angefügt. scPvuII trägt C-terminal eine SH-Gruppe, die mit der Maleimid-Gruppe des Crosslinkers reagiert. Dafür wurden 20 μM scPvuII mit 80 μM GMBS-TFO für 1 h bei Raumtemperatur in $1 \times \text{PBS}$ inkubiert. Die Crosslinkausbeute kann mit 1 mM TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid) leicht gesteigert werden. Die Ausbeute der Crosslinkreaktion wurde durch SDS-PAGE quantifiziert, da das TFO-scPvuII-Heterokonjugat andere Laufeigenschaften besitzt als die freie scPvuII (siehe Kapitel 2.5.2.2).

2.4.7.1 Reinigung der TFO-scPvuII Chimäre

Die Ausbeute der Kopplungsreaktion liegt zwischen 60 % und 90 %. Der Anteil freier nichtgekoppelter PvuII würde in adressierten Spaltexperimenten alle Substrate, adressiert wie nicht-adressiert, spalten. Deshalb muss dieser Anteil an freiem Enzym (scPvuII) vom TFO-scPvuII-Heterokonjugat abgetrennt werden. Es wurden verschiedene Möglichkeiten, wie z.B. Anionenaustauschchromatographie mit MonoQ- oder DE52-Matrix, Reinigung über *triple-helix* Bildung des TFOs an ein spezifisches biotilyliertes Substrat mit Bindung an Streptavidin-magnetic-beads, oder die Verwendung einer Carboxypeptidase (das C-terminale TFO schützt das C-terminale Ende des Proteins vor dem Verdau), sowie verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung der Anionenaustauschchromatographie mit DE52-Cellulose die beste Reinigung ermöglichte. Hierfür wurde eine Pasteurpipette mit Glaswolle verschlossen, mit 500 μl DE52-Cellulose befüllt und mit Puffer (10 mM Tris-Phosphat, pH 7,5, 3 mM EDTA, 100 mM NaCl) äquilibriert. Diese Säule wurde mit 2 ml Crosslinkreaktionsansatz mit einer maximalen Konzentration von 1 μM Protein

beladen. In 100 mM NaCl bindet kein freies scPvuII an diese Säule, sondern wird im Durchlauf eluiert. Zum vollständigen Abtrennen des freien Proteins wird die Säule mit 20 ml eines steigenden NaCl-Gradienten bis 400 mM NaCl gewaschen, um jedwede Verunreinigungen durch freie scPvuII zu verhindern. Das homogene TFO-scPvuII-Heterokonjugat eluiert bei ca. 350 mM NaCl. Es wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt und über SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 2.5.2.2). Dazu wurden 250 µl der Fraktionen mit Aceton gefällt (250 µl Eluat wurden mit 1 µl Glycogen und 1 ml Aceton 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 14000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, mit 20 µl LAP aufgekocht und auf Eis abgeschreckt.) und auf das SDS-Gel (6 %iges Sammelgel und 15 %iges Trenngel: Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 bzw. 430 mM Tris-HCl, pH 8,8) aufgetragen. Mit einer anschließenden Silberfärbung (Hofer-, „*automatic gel stainer*“ mit entsprechendem Protokoll, Pharmazia) wurden die Banden sichtbar gemacht. Anhand des Gelbildes konnten die Fraktionen ausgewählt werden, die das TFO-scPvuII-Heterokonjugat enthielten. Anschließend wurden die Fraktionen gegen 1 × PBS mit 25 % PEG 20000 so lange dialysiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist.

2.4.8 Nachweis der *triple-helix*

2.4.8.1 Circular dichroismus (CD)

Der Nachweis der *triple-helix* erfolgte zuerst über eine CD-Messung (*circular dichroism*) bei Wellenlängen von 220 nm bis 340 nm. DNA zeigt einen negativen Peak bei 250 nm und einen positiven Peak bei 256 nm. Dieses Spektrum wird durch Ausbildung einer *triple-helix* charakteristisch verändert.

Es wurden verschiedene TFOs (siehe Kapitel 2.1.4.2) bei verschiedenen Bedingungen (Purin- (TFO1) und Pyrimidinmotif (TFO2)) untersucht [Arimondo et al., 1999; Sen and Graslund, 2000]. Die *triple-helix* Bildung erfolgte, indem 10 µM doppelsträngiges Substrat mit 10 µM TFO1, 2 M NaCl, 1 × TP (80 mM Tris-Phosphat, mit H₃PO₄ auf pH 6,5 eingestellt) für 1 h bei 37 °C und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gelagert wurden. Die Messung erfolgte bei 5 °C, um die *triple-helix* zu stabilisieren. Unter den gleichen Bedingungen wurden das verwendete Substrat, das TFO1 und TFO2 sowie ein unspezifisches Kontroll-Oligonukleotid (TFO3) einzeln gemessen. Als Kontrolle wurde das unspezifische TFO3 mit dem jeweiligen doppelsträngigen Substrat unter *triple-helix*-Bildungsbedingungen inkubiert und gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem die normierte Summe der

Einzelkurven von TFO und doppelsträngigem Substrat mit der gemessenen Kurve der beiden zusammen nach Inkubation verglichen wurde.

2.4.8.2 „*electrophoretic mobility shift assay*“

Für die Untersuchung der Bindung eines spezifischen modifizierten Oligonukleotids (TFO) an ein doppelsträngiges DNA-Substrat über *triple-helix* Bildung wurde das TFO in unterschiedlichen Konzentrationen [5 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM; 0,25 µM, 0,125 µM, 0,0625 µM, 0,05 µM, 0,005 µM] mit einer gegebenen Menge Substrat [0,05 µM] für 1 h bei 37 °C in 1 × TP (80 mM Tris-Phosphat, pH 7) inkubiert. Dabei wurden fünf verschiedene Bindungsbedingungen untersucht:

Tabelle 2-11: „*electrophoretic mobility shift assay*“: jeweilige Bindungsbedingungen zur Untersuchung der *triple-helix* Bildung, bei der 0,05 µM DNA-Substrat mit 5 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM; 0,25 µM, 0,125 µM, 0,0625 µM, 0,05 µM, 0,005 µM TFO titriert wurde; die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C in 1 x TP

| Ansatz | 1 | 2 | 4 | 4 | 5 |
|-------------------|------|--------|--------|-------|-------|
| DNA-Substrat | + | + | + | + | + |
| Spermin | 1 mM | - | - | - | - |
| NaCl | - | 50 mM | 100 mM | - | - |
| MgCl ₂ | - | 100 mM | - | 10 mM | - |
| Neomycin | - | - | - | - | 20 mM |
| TFO | + | + | + | + | + |
| Kontrolle TFO3 | + | + | + | + | + |

Die Spezifität der Bindung wurde mit Hilfe eines unspezifischen 16mer-Kontroll-Oligonukleotides (TFO3) überprüft. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte mit einem nativen 15 % Polyacrylamid-Gel (19:1) in 1 × TP (80 mM Tris-Phosphat, mit H₃PO₄ auf pH 6,5 eingestellt), bei einer Stromstärke von 12 mA für 12 h (siehe Kapitel 2.4.3). Gebundene DNA zeigt im nativen Polyacrylamid-Gel eine langsamere Laufgeschwindigkeit als ungebundene DNA. Wird die Substrat-DNA mit [γ -³²P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert (siehe Kapitel 2.4.6.1), kann man die Auftrennung der DNA-Banden mit dem Instant Imager (Packard) quantifizieren.

2.4.8.3 „*cleavage protection assay*“

FokI spaltet die DNA nicht in seiner Bindestelle wie Typ IIP-Restriktionsendonukleasen, sondern 9 Basen im oberen und 13 Basen im unteren Strang *downstream* von der Bindestelle entfernt. Wird in dieser Spaltregion eine *triple-helix* durch ein TFO ausgebildet, so kann FokI sein Substrat zwar noch binden, aber nicht mehr spalten. Die Spaltstelle ist geschützt.

Mit Hilfe einer PCR wurde ein 174 bp langes PCR-Produkt auf dem pUCDmuttriple-FokI Plasmid erzeugt und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.4.1 und 2.4.5.1). 1 μ M PCR-Produkt wurde im „*cleavage protection assay*“ mit 10 μ M modifiziertem TFO5 und 10 μ M MgCl₂ für 1 h bei 37 °C in 1 \times TP Bindungspuffer (80 mM Tris-Phosphat, pH 7,2) vorinkubiert. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von 10 U FokI und FokI-Spaltpuffer (NEB, Frankfurt) gestartet. Zu bestimmten Zeiten wurde die Spaltreaktion von jeweils 10 μ l Aliquots durch Zugabe von 5 μ l 5 \times AAP abgestoppt. Eine Kontrollspaltung erfolgte analog dazu mit einem unspezifischen TFO3. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte auf einem 12 %igen Polyacrylamid-Gel (siehe Kapitel 2.4.2).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinaufreinigung

Die *single-chain* Variante von PvuII (scPvuII) trägt einen C-terminalen Histidin-*tag* und kann deshalb über Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Chelatagarosesäule aufgereinigt werden.

Nachdem das Protein in *E.coli* exprimiert wurde, wurden die Bakterien nach folgendem Protokoll aufgeschlossen:

Das Bakterienpellet der präparativen Fermentation (10 Liter-Fermenter) wurde für ca. 30 min auf Eis aufgetaut und in 40 ml Aufschlußpuffer (PDL, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT) durch kräftiges Vortexen suspendiert. Zellaufschluss erfolgte durch 10 \times Ultraschallbehandlung (*Sonifier* 250, Branson, Danbury): *output control* 5, *duty cycle* 50 %) alle 30 sec für jeweils 30 sec in einem 50 ml Becherglas mit präparativer Spitze auf Eis. Nach anschließender Zentrifugation (30 min, 4 °C, 20000 g) wurde der Überstand auf 2 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden), die in Aufschlußpuffer äquilibriert wurde, in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min bei 4 °C auf einem Rolltisch inkubiert. Nach 3-maligem

Waschen mit jeweils 40 ml Aufschlußpuffer und Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 1000 g), wurde mit 2 ml Elutionspuffer (PEDL, 0,5 M NaCl, 200 mM Imidazol, 1 mM DTT) eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen 1,5 l Puffer (PEDL, 0,3 M NaCl, 77 % Glycerin, 1 mM DTT) dialysiert, und das Dialysat wird bei -20 °C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch UV-Absorptionsmessung am Spektralphotometer (OD_{280 nm}).

2.5.2 Analyse

2.5.2.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinen kann photometrisch bestimmt werden, indem man deren Absorption bei 280 nm misst. Dies beruht darauf, dass die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei dieser Wellenlänge das Licht absorbieren. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten ϵ des Proteins kann die Konzentration dieses Proteins berechnet werden. Für scPvuII gilt: $\epsilon = 71240 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $1 \text{ OD}_{280} \triangleq 0,53\text{mg/ml}$.

2.5.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE nach Laemmli [Lämmli et. al, 1970] ist eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Anwesenheit von SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach Größe. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches an Proteine bindet und diese partiell entfaltet, so daß diese eine fast einheitliche Struktur annehmen. Dadurch ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der elektrophoretischen Mobilität des Polypeptids im Bereich von 10 bis 200 kDa.

Die Proben für die SDS-PAGE wurden mit Aceton gefällt. Dadurch erreicht man eine Aufkonzentrierung der Proteine und entfernt gleichzeitig Verunreinigungen durch Salz und Harnstoff.

2.5.2.3 Bindung: Fluoreszenzanisotropie

Neben *electrophoretic mobility gel shift* Experimenten ist die Fluoreszenzanisotropie-Messung eine weitere sensitive Methode, mit der man DNA-Bindungsaffinitäten von Proteinen messen kann. Dazu wird das Oligonukleotid mit einem Fluorophor (z.B.: Eosin, Dansylchlorid oder Hexachlorfluoreszein) markiert. Das markierte Oligonukleotid hat in

Lösung eine bestimmte Beweglichkeit, die von Masse, Größe und Form des Oligonukleotids abhängt. Bestrahlt man die Fluorophore mit polarisiertem Licht, wird das angeregte Fluoreszenzlicht aufgrund der Bewegung der Moleküle nach allen Seiten emittiert. Diese Emission unterliegt einer statistischen Verteilung. Vor der Photokathode, die das emittierte Licht misst, befinden sich Polarisationsfilter, die nur den statistisch nicht-diffusen horizontalen bzw. vertikalen Lichtanteil auf die Photokathode durchlassen. Damit wird weniger Licht gemessen als eingestrahlt. Bindet nun ein anderes Molekül, z.B. ein Protein an das DNA-Substrat, erhöht sich dessen Gesamtmasse. Dadurch wird seine Bewegung in Lösung entsprechend dieser erhöhten Masse langsamer. Wird nun das fluoreszenzmarkierte DNA-Substrat mit polarisiertem Licht bestrahlt, so erhöht sich der Anteil des nicht-diffus emittierten Lichts des Fluorophors in Abhängigkeit zur Bindung. Damit erreicht mehr Licht die Photokathode als bei den beweglicheren leichteren Molekülen. Die Ermittlung der Anisotropie erfolgte durch Messung des horizontalen (I_{VV}) und vertikalen (I_{VH}) Emissionslichts. Daraus wird die Anisotropie nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Anisotropie} = (I_{VV} - I_{VH}) / (I_{VV} + 2I_{VH})$$

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Bindung von Molekülen unter natürlichen Bedingungen in Lösung untersucht werden kann, denn gebundenes und ungebundenes Substrat liegen im Gleichgewicht zueinander vor. Diese Methode ist außerdem sehr sensitiv. Wenn man einen Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Fluoreszenzausbeute (Hexachlorofluoreszein) verwendet, kann sogar im nanomolaren Bereich gemessen werden.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität eines Moleküls titriert man verschiedene Mengen dieses Moleküls mit einer bestimmten Menge an fluorophormarkiertem Substrat und ermittelt die Änderung der Fluoreszenzanisotropie in Abhängigkeit zur Konzentration. Daraus kann die Bindungskonstante berechnet werden.

Die Bindungseigenschaften von scPvuII wurden mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen in 1 × Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) in Gegenwart von 10 mM Ca^{2+} oder 3 mM EDTA bei Raumtemperatur charakterisiert. Dazu wurde ein 17 bp langes doppelsträngiges Oligonukleotid, welches die spezifische Erkennungssequenz von PvuII (CAGCTG) trägt und an einem Strang mit Hexachlorofluoreszein markiert ist, mit scPvuII titriert. Die Ermittlung der Fluoreszenzanisotropie erfolgte durch Messung des horizontalen und vertikalen Emissionslichts zwischen 550 nm bis 570 nm bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm polarisiertem Licht an einem Fluorimeter (F-4500, Hitachi Colora Messtechnik,

Lorch). Die Bindungskonstante wurde mit Hilfe eines Microsoft-Tabellenkalkulationsprogrammes (EXCEL) ermittelt.

Tabelle 2-12: Oligonukleotid mit PvuII-Bindungsstelle (unterstrichen), am 5'-Ende mit Hexachlorofluoreszein (HEX) markiert, zur Bildung eines doppelsträngigen Substrat mit einem entsprechendem komplementärem Oligonukleotid für Fluoreszenzanisotropiemessungen

| Oligo | Sequenz |
|-------------|---------------------------------------|
| Cognate HEX | HEX-5'-TCTAGGC <u>CAGCTG</u> CGGAT-3' |

2.5.2.4 SDS-PAGE mit Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten TFO-scPvuII-Heterokonjugates erfolgte über SDS-PAGE. Es wurde eine Eichgerade mit freiem scPvuII erstellt, mit Hilfer derer die Konzentration des TFO-scPvuII-Heterokonjugates bestimmt werden konnte. ScPvuII wurde in folgenden Mengen zur Erstellung der Eichgeraden eingesetzt: 42 pmol, 85 pmol, 170 pmol, 255 pmol, 425 pmol. Die Auswertung erfolgte mit einem Videodokumentationssystem (Biometra).

2.5.2.5 Expressionsanalyse mittels Western-Blot

Der Western-Blot ist ein empfindliches Verfahren zur Detektion bestimmter Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung. Dazu müssen die in einem Gel aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran durch *blotting* übertragen werden [Timmons and Dunbar, 1990]. Danach werden reaktive Gruppen durch „Blocken“ mit Magermilchpulver abgedeckt, bevor der erste proteinspezifische Antikörper hinzugegeben wird.

Der zweite Antikörper weist spezifisch den ersten nach. Dieser Antikörper ist an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die von 3-{4-Methoxyspiro(1,2-dioxetan-3,2'-tricyclo[3,3,1,1^{3,7}]-dekan)}phenylphosphat (AMPPD) das Phosphat abspaltet, wobei eine metastabile Verbindung entsteht, die unter Lichtemission bei 470 nm zerfällt. Dieses emittierte Licht kann auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Dieses Nachweissystem ist hoch empfindlich, so dass weniger als 0,01 ng Protein/mm² Blotmembran nachgewiesen werden können.

Die verschiedenen ECFP-PvuII-Fusionsproteine (siehe Kapitel 2.2.1.2) wurden in HEK293T Zellen überexprimiert und mit Hilfe von Western-Blot analysiert. Dafür wurden die Zellen mit „TransFast“ (Promega, Mannheim) transformiert (siehe Kapitel 2.3.1.2). Nach einer 48-

stündigen Expressionsphase wurden die Zellen aus den Gewebekulturschalen geschabt, in PvuII-Aufschlusspuffer aufgenommen und mit Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Chelatagarose gereinigt (siehe Kapitel 2.5.1). Das Eluat wurde über einen Western-Blot und einen Aktivitätstest analysiert.

Für den Western-Blot wurden 15 µl vom Eluat entnommen, das mit Hilfe eines 15 % SDS-Gels (15 V, 400 mA) aufgetrennt (siehe Kapitel 2.5.2.2) und anschließend auf eine Membran übertragen wurde. Diese Membran wurde anschließend über Nacht in *blocking*-Puffer (1 × PBS und 5 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert und dann zweimal mit jeweils 20 ml Waschpuffer (TBST = 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Der erste Antikörper (α -EGFP) wird 1:5000 in Verdünnungspuffer verdünnt und 1 h mit dem Gel inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen und der zweite Peroxidase-gekoppelte Antikörper, (α -rabbit) 1:2000 in Verdünnungspuffer (Waschpuffer (TBST) + 1 % (w/v) Magermilchpulver) verdünnt und mit der Membran für 2 h inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen (5 min, 10 min, 15 min). Die „Entwicklung“ der Membran erfolgte mit ECL-Western-Blotting-Reagenz (Amersham, Freiburg). Zur Detektion wurden Röntgenfilme auf die Membran aufgelegt und unterschiedlich lange belichtet (15 sec, 30 sec, 60 sec, 120 sec, 5 min, 10 min)

Die andere Hälfte bzw. der Rest des Eluates des exprimierten Proteins aus HEK293T Zellen wurde in einen Aktivitätstest eingesetzt: 0,8 µl pUCD [260 ng/µl], 4 µl 10 × PvuII-Puffer, 5,2 µl H₂O, 30 µl Eluat wurden für 30 min und 2 h bei 37 °C inkubiert und auf einem 0,8 % Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.4.1.1) analysiert.

2.6 Enzymatische Charakterisierung

2.6.1 Adressierte Spaltung

In der adressierten Spaltung sollte ein Restriktionsenzym-TFO-Heterokonjugat, bestehend aus TFO-scPvuII, so programmiert werden, dass es in Anwesenheit mehrerer PvuII-Spaltstellen im Genom nur diejenige spaltet, die von einer im definierten Abstand benachbarten *triple-helix* Bindungsstelle flankiert ist. Diese Spaltstelle wird demzufolge adressiert gespalten, im Gegensatz zu den anderen Spaltstellen, die nicht oder schlechter gespalten werden.

Zuerst wurden mit mehreren PCR-Substraten die optimalen Bedingungen für solch eine Programmierung untersucht. Dafür wurde der Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle für zwei Linkerlängen (C6 und C12), die TFO und scPvuII verbinden, untersucht. Für die gefundene optimale Konstellation wurde die adressierte Spaltung auch mit

makromolekularem Substrat, *supercoil* und linearer Plasmid-DNA, in einigen Experimenten auch in Konkurrenz mit genomischer DNA (λ -DNA), sowie unter verschiedenen Ionenstärken untersucht.

2.6.1.1 Adressierte Spaltung auf PCR-Substrat

Zur adressierten Spaltung wurde die Spaltpräferenz des TFO-scPvuII-Heterokonjugates hinsichtlich zweier radioaktiv markierter PCR-Substrate (siehe Kapitel 2.4.4.2 und Kapitel 2.4.5.2) untersucht. Dafür wurden zwei in ihrer Sequenz ähnliche PCR-Substrate in einer Konkurrenz-Spaltreaktion eingesetzt, das nicht-adressierte Substrat ohne *triple-helix* Bindungsstelle und das adressierte Substrat mit *triple-helix* Bindungsstelle. In Abwesenheit des Kofaktors von scPvuII (Mg^{2+}) soll das TFO-scPvuII-Heterokonjugat nur solche DNA-Sequenzen binden, bei denen das TFO eine spezifische *triple-helix* ausbilden kann. Nach Zugabe des Kofaktors werden demzufolge nur solche DNA-Substrate gespalten, auf denen sich die *triple-helix* Bindungsstelle in geeigneter Entfernung zur PvuII-Spaltstelle befindet.

Die Ausbildung der *triple-helix* erfolgte durch Inkubation von äquimolaren Mengen doppelsträngigem radioaktiv markiertem spezifischen Substrat und TFO-scPvuII-Heterokonjugat (jeweils 45 nM) über Nacht in $1 \times$ TP Puffer (80 mM Tris-Phosphat, pH 7,2), 1 mM Spermin und 3 mM EGTA bei Raumtemperatur. Kurz vor Start der Spaltung wurde der Ansatz für 2 min auf 37 °C vorgewärmt. Der eigentliche Start der Spaltung erfolgte durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer mit der entsprechenden Menge $MgCl_2$, so dass sich das Volumen des Spaltansatzes um das Volumen des Inkubationsansatzes vermehrte. Die Reaktionen wurden mit 5 mM, 2,5 mM und 1,25 mM $MgCl_2$ gestartet. In bestimmten Zeitintervallen wurde jeweils ein Probenaliquot mit 0,3 Volumen $5 \times$ AAP abgestoppt.

Es wurden zwei verschiedenen Linkerlängen ($(CH_2)_6$ und $(CH_2)_{12}$) sowie sechs verschiedene adressierte Substrate (238mer) mit unterschiedlichem Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle (3 pb, 5 bp, 7 bp, 9 bp, 11 bp, 13 bp) hinsichtlich ihrer Spaltpräferenz untersucht. Das nicht-adressierte Substrat (478mer) diente jeweils als externe oder interne Kontrolle.

Dazu wurden die zwei Substrate, adressiert und nicht-adressiert, einerseits parallel in Einzelreaktionen und andererseits in Konkurrenz zueinander eingesetzt. Die Spaltung wurde in beiden Reaktionen direkt gestartet, ohne Vorinkubation zwischen TFO-scPvuII, so dass noch keine *triple-helix* ausgebildet wurde und demzufolge beide Substrate ohne Präferenz gespalten werden.

Der Einfluß der Ionenstärke auf die Spaltpräferenz wurde nur für das TFO-scPvuII-Heterokonjugat mit $(\text{CH}_2)_{12}$ -Linker in einer Kompetitionsreaktion von nicht-adressiertem Substrat und adressiertem Substrat mit 9 bp Abstand zwischen *triple-helix* Bindungsstelle und PvuII-Spaltstelle untersucht. Dabei wurde die Ionenstärke durch unterschiedliche Mengen NaCl (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM) variiert. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der im Reaktionsansatz 2,5 mM und 1,25 mM MgCl_2 enthielt, gestartet.

Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte auf einem 12 %igen Polyacrylamid Gel (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, siehe Kapitel 2.4.2) über Quantifizierung mit dem Instant Imager. Die Daten wurden durch Anpassung einer exponentiellen Funktion mit EXCEL ausgewertet.

Makromolekulares Substrat: Plasmid-DNA, *supercoil*

Die adressierte Spaltung wurde anschließend auf einem makromolekularen Substrat durchgeführt. Dafür wurde das pECFP-ICAD-S(NLS) Plasmid mutiert, indem eine zusätzliche PvuII Schnittstelle mit benachbarter 9 Basen entfernter *triple-helix* Bindungsstelle an Position 2288 eingefügt (siehe 2.4.3.3) und damit das Substratplasmid pECFP-ICAD-S(NLS)+PvuII erzeugt. Dieses Plasmid wurde mit äquimolaren Mengen TFO-scPvuII Heterokonjugat mit $(\text{CH}_2)_{12}$ -Linker ohne Mg^{2+} für 12 h bei Raumtemperatur in 1xTP, 1 mM Spermin, 3 mM EGTA und 10 % Glycerin zur Ausbildung der *triple-helix* vorinkubiert. Vor dem Start der Kinetik wurde der Ansatz für 2 min auf 37°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem gleichem Volumenanteil PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl_2 und 100 mM NaCl enthielt, gestartet. In bestimmten Zeitintervallen wurde jeweils ein Probenaliquot mit 0,3 Volumen $5 \times$ AAP abgestoppt. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte mit einem 0,8 % Agarosegel (siehe Kapitel 2.4.1.1), das mit 0,00025 % (v/v) SYBR Gold (Eugene, Leiden) gefärbt und mit Biometra-Software (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) ausgewertet wurde.

2.6.1.2 Makromolekulares Substrat: Plasmid-DNA, linearisiert

Die adressierte Spaltung der linearen Plasmid-DNA erfolgte analog der Spaltung mit *supercoil* Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.6.1.1). Das Plasmid wurde dazu mit HindIII an Position 5156 linearisiert und anschließend gereinigt. Die Analyse der entsprechenden Spaltprodukte erfolgte mit einem 0,8 % Agarosegel (siehe Kapitel 2.4.1.1), das mit 0,00025 %

(v/v) SYBR Gold (Eugene, Leiden) gefärbt und mit Biometra-Software (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) ausgewertet wurde.

2.6.1.3 Makromolekulare Plasmid-DNA in Konkurrenz mit genomischer DNA (λ -DNA)

Die adressierte Spaltung erfolgte auf dem pPI_2 Plasmid, welches an Position 987 eine zusätzliche, adressierte PvuII-Spaltstelle trägt. Dabei befand sich die *triple-helix* Bindungsstelle 9 bp von der PvuII-Spaltstelle entfernt. Die adressierte Spaltung erfolgte in Konkurrenz mit einem Überschuss an genomischer DNA (λ -DNA), welche 15 PvuII-Spaltstellen besitzt. Es wurden 0,007 pmol pPI_2 Plasmid, 0,045 pmol λ -DNA mit 0,006 pmol TFO-scPvuII Heterokonjugat ohne Kofaktor Mg^{2+} für 3 Tage bei Raumtemperatur in 1xTP, 1,5 mM Spermin, 6 mM EGTA und 10 % Glycerin zur Ausbildung der *triple-helix* vorinkubiert. Vor dem Start der Kinetik wurde der Ansatz für 2 min auf 37°C erwärmt. Durch Zugabe eines gleichen Volumenanteils PvuII-Spaltpuffer, der 3 mM $MgCl_2$ und 100 mM NaCl enthielt, wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 min und 120 min wurde ein Aliquot der Reaktion durch Zugabe von 5xAAP gestoppt. Die Analyse erfolgte auf einem 0,8 %igen Agarose Gel (siehe Kapitel 2.4.1.1), das mit 0,00025 % SYBR Gold gefärbt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Bindungsaktivitäten von TFOs via *triple-helix* Bildung

TFOs (*triple-helix forming* Oligonukleotide) bilden eine stabile *triple-helix* an homopurin- oder homopyrimidinreichen Sequenzen [Francois et al., 1989; Griffin and Dervan, 1989]. Dabei erfolgt die *triple-helix*-Bildung unter sehr stringenten Bedingungen, wie z.B. unter Vorhandensein zweiwertiger Ionen oder eines sauren pH Werts (Pyrimidin-Motiv) [Singleton and Dervan, 1992]. Für die Verwendung von TFOs im zellulären Milieu benötigt man jedoch eine spezifische *triple-helix* Bildung im physiologischen Bereich. Deshalb wurden die Bindungseigenschaften von unterschiedlichen TFOs analysiert und das TFO modifiziert, um die *triple-helix* Bildung unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *triple-helix* Bildung von drei spezifischen TFOs und einem unspezifischen TFO untersucht. Zuerst wurde die Bildung der *triple-helix* mit dem purinreichen TFO1 (siehe Abb. 3-1), dem pyrimidinreichen TFO2 (siehe Abb. 3-2) und als Kontrolle mit dem unspezifischen TFO3 mit Hilfe von CD-Spektroskopie hinsichtlich Temperatur, Na⁺-Ionen und pH-Wert analysiert.

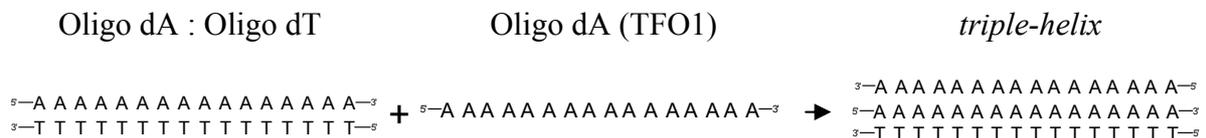


Abbildung 3-1: Schema der *triple-helix* Bindung des purinreichen TFO1 in antiparalleler Orientierung zum Purinstrang des 16mer Oligo dA : Oligo dT dsDNA-Substrats.

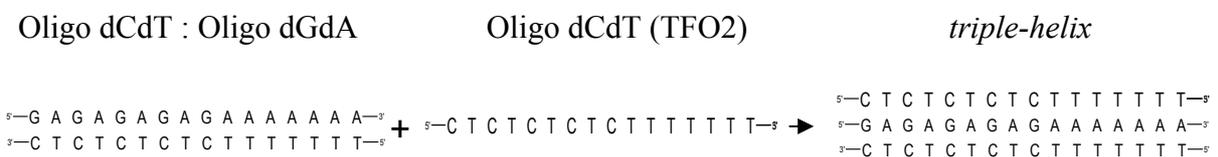


Abbildung 3-2: Schema der *triple-helix* Bindung des pyrimidinreichen TFO2 in paralleler Orientierung zum Purinstrang des 16mer Oligo dGdA : Oligo dCdT dsDNA-Substrats.

3.1.1 Circular Dichroismus (CD)

Circular Dichroismus (CD) kann beobachtet werden, wenn optisch aktive Substanzen rechts und links linear polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. CD ist eine Funktion der

Wellenlänge. CD-Spektren geben Informationen über die Sekundärstrukturen von Makromolekülen. Dabei sind diese Spektren typisch für die jeweilige Art Molekül, wie z.B. Proteine oder Nukleinsäuren.

Für die Messung der *triple-helix* Bildung wurden CD-Spektren im Bereich von 220 nm bis 340 nm aufgenommen. Es wurden die Spektren von der *triple-helix*, dem dsDNA-Substrat und dem TFO gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem das Spektrum der *triple-helix* gegen das Spektrum der normierten Summe der Einzelspektren von Substrat und TFO aufgetragen wurde. Zuerst wurde das Purin-Motiv mit TFO1 untersucht (siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3a). Die gleichen Bedingungen wurden für die CD-Messungen mit einem unspezifischen Kontroll-TFO3 (siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3b) verwendet. In Abbildung 3-3a ist deutlich zu sehen, dass eine *triple-helix* mit dem spezifischen TFO1 gebildet wurde, da die blaue Kurve zwar den typischen DNA-Peak bei 250 nm zeigt, jedoch im Bereich von 260 – 300 nm deutlich von dem Spektrum der normierten Summe der Einzelspektren abweicht. Das unspezifische TFO3 bildete keine *triple-helix*, da wie Abbildung 3-3b verdeutlicht, das blaue Spektrum mit der normierten Summe der Einzelspektren übereinstimmt.

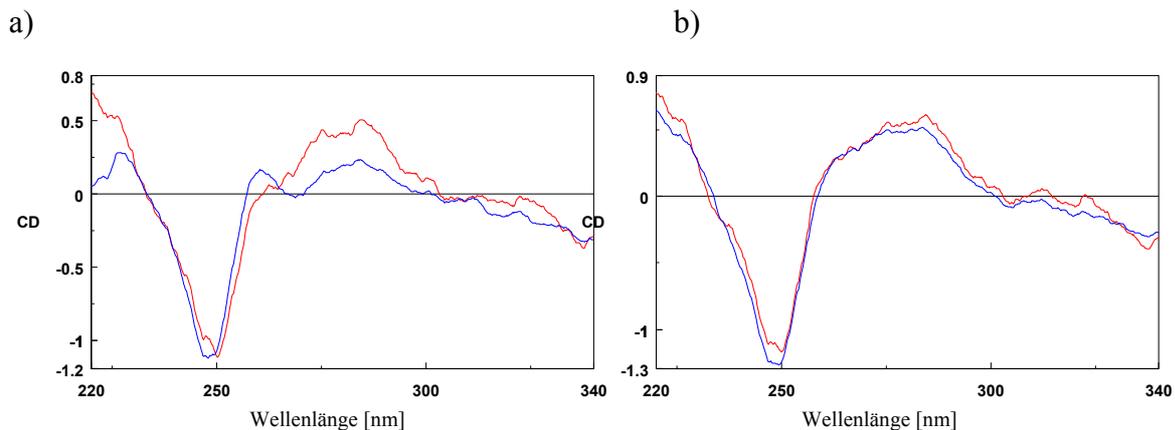


Abbildung 3-3: CD-Spektren eines 16mer Oligo dA : Oligo dT dsDNA-Substrates (siehe Abb. 3-1) bei 5 °C, pH 6,5 und 2 M NaCl nach Zugabe von äquimolaren Mengen spezifischem TFO1 (a) oder unspezifischem TFO3 (b).

rot: normierte Summe der Einzelspektren von Substrat und TFO
 blau: Spektrum der TFO-dsDNA Lösung

Damit konnte gezeigt werden, dass ein 16mer Oligo dA-TFO1 eine *triple-helix* (Purin-Motiv) durch Inkubation für 1 h bei 37 °C und 1 h bei RT ausbilden kann. Jedoch sind dafür extrem unphysiologische Bedingungen (pH 6,5; 5 °C, 2 M NaCl) erforderlich. Deshalb wurde ein weiteres TFO hinsichtlich seiner *triple-helix* Bildung untersucht. Dieses TFO2 bildet im Gegensatz zu TFO1 die *triple-helix* im Pyrimidin-Motiv, da es aus einer gemischten Cytosin-Thymin Sequenz besteht.

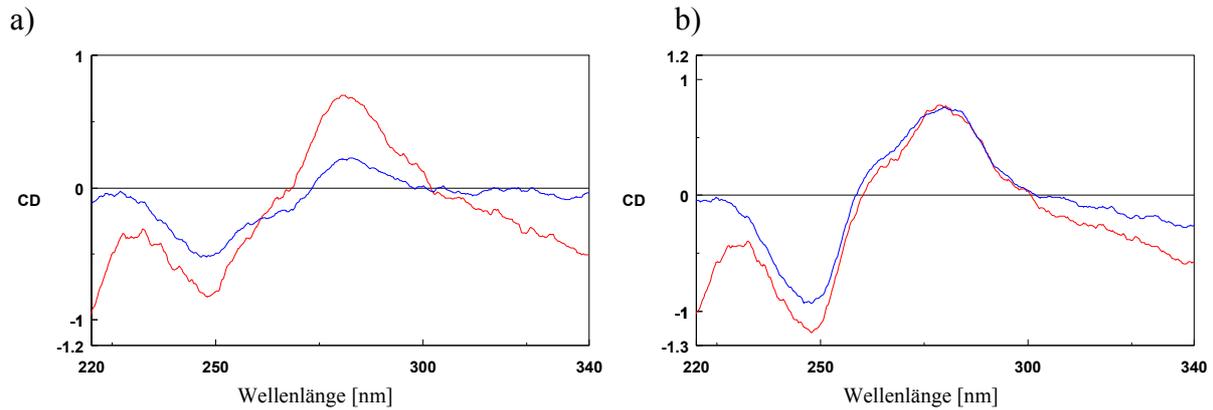


Abbildung 3-4: CD-Spektren eines 16mer dsDNA-Substrates mit gemischter Pyrimidin-Sequenz (siehe Abb. 3-2) bei 5 °C, pH 7,2 und 2 M NaCl nach Zugabe von äquimolaren Mengen spezifischem TFO2 (a) oder unspezifischem TFO3 (b).

rot: normierte Summe der Einzelspektren von Substrat und TFO
 blau: Spektrum der TFO-dsDNA Lösung

Diese Abbildungen zeigen, wie auch Abbildung 3-3, dass das TFO2 eine *triple-helix* ausbildet, da das blaue Spektrum der *triple-helix* stark vom Spektrum der normierten Summe der Einzelspektren abweicht (Abbildung 3-4a). Das unspezifische TFO3 ist dazu nicht in der Lage, denn wie Abbildung 3-4b zeigt, sind die Spektren identisch. Betrachtet man die Bedingungen, die zur Ausbildung der *triple-helix* notwendig sind, so kann man feststellen, dass die *triple-helix* bei einem physiologischer pH-Wert von 7,2 gebildet wurde, jedoch Temperatur (5 °C) und NaCl-Konzentration (2 M) immer noch zu stark von den physiologischen Bedingungen einer Zelle abwichen.

3.1.2 „*electrophoretic mobility shift assay*“

Um eine *triple-helix* Bildung unter physiologischen Bedingungen zu erhalten, wurde das TFO4 hinsichtlich seiner Fähigkeiten zur *triple-helix* Bildung mit Hilfe eines *electrophoretic mobility shift assays* untersucht. Die *triple-helix* wurde in diesem Experiment durch Zugabe von Spermin [Arimondo et al., 1999; Arya et al., 2001; Xue et al., 2002] und unter Verwendung von Basenmodifikation (5-Methyl-2'-deoxycytidin (5meC) und 5-(1-Propynyl)-2'-deoxyuridin (pdU) stabilisiert (Abbildung 3-5) [Lacroix et al., 1999; Phipps et al., 1998; Xodo et al., 1994].

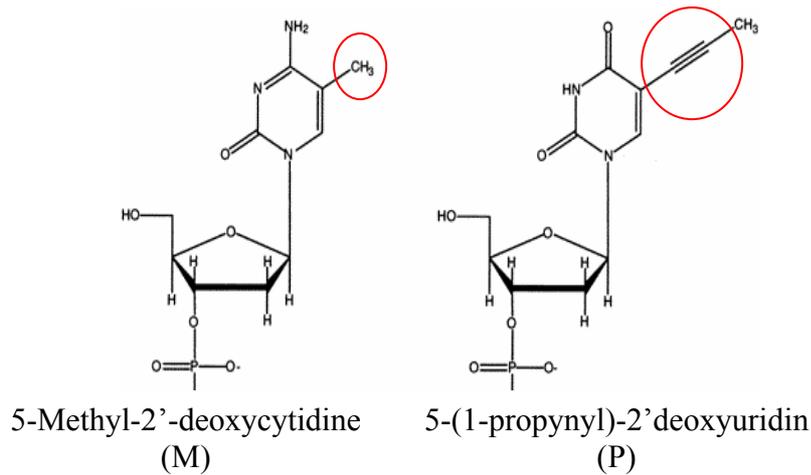


Abbildung 3-4: Modifizierte Basen zur Erhöhung der *triple-helix*-Stabilität. 5-Methylcytosin (M) ersetzt Cytosin and 5-(1-Propynyl)-Uracil(P) ersetzt Thymin

Um eine Bindungskonstante bestimmen zu können, wurde 50 nM doppelsträngiges radioaktiv markiertes Substrat (16mer) (siehe Abb. 3-2) mit unterschiedlichen Mengen TFO4 titriert (Abbildung 3-5).

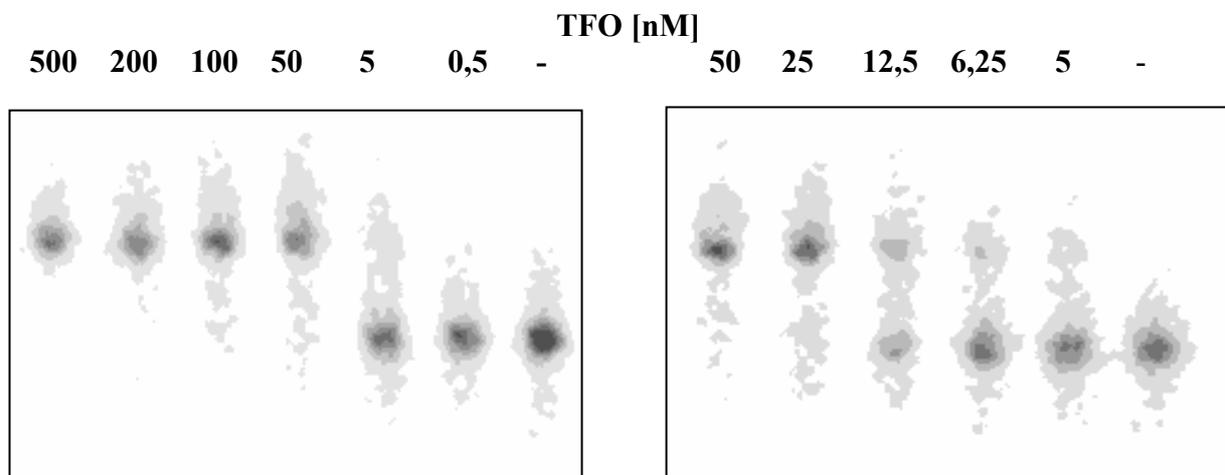


Abbildung 3-5: *Mobility gel shift assay*: Autoradiogramm eines 12 %igen Polyacrylamid-Gels, auf dem das 5'-markierte doppelsträngige Substrat nach Inkubation (1 h, 37 °C) mit unterschiedlichen Mengen unmarkiertem, modifiziertem TFO4 (spezifisch), RT, 10 mM Spermin, 0 mM NaCl, pH 7,2 aufgetrennt wurde; Grobtitration (links), Feintitration (rechts).

In Abbildung 3-5 kann man erkennen, dass die Ausbildung einer *triple-helix* zu einem verlangsamten Laufverhalten des doppelsträngigen Substrates im Gel führt. Dabei wird deutlich, dass die Zugabe von 50 nM TFO zu 50 nM Substrat zu einer stöchiometrischen Ausbildung der *triple-helix* unter physiologischen Bedingungen (pH 7,2, RT) führt, da das gesamte Substrat bei einem 1 : 1-Verhältnis von TFO zu Substrat ein verlangsamtes Lauf-

verhalten zeigt. Nach einer Quantifizierung mit Hilfe des Instant Imagers (Packard), konnten die Titrationenkurven zur Bestimmung der Bindungskonstanten der *triple-helix* ausgewertet werden (Abb. 3-7).

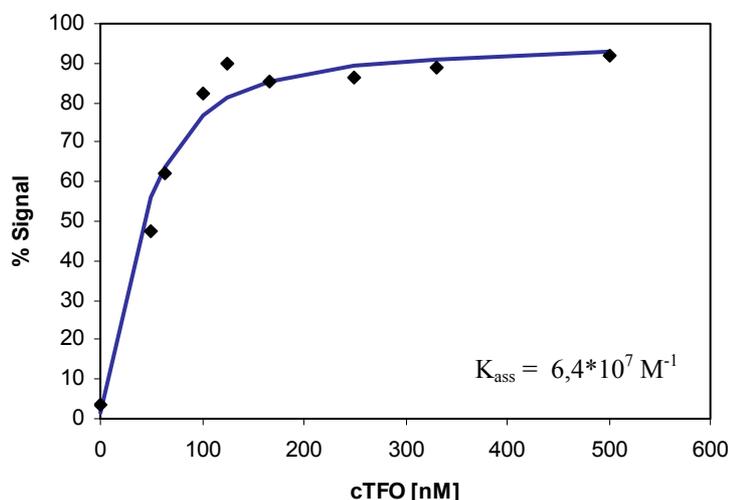


Abbildung 3-6: Bestimmung der Bindungskonstante von TFO4 durch nicht-lineare Kurvenanpassung;

Eine Bindungskonstante von $K_{\text{ass}} = 6,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ zeigt, dass das TFO4 unter physiologischen Bedingungen sehr fest in einer *triple-helix* gebunden wurde. Deshalb ist das TFO4 mit seinen Basenmodifikationen für die Verwendung in Experimenten zur adressierten Spaltung vorzüglich geeignet.

3.1.3 „cleavage protection assay“

Mit Hilfe eines *cleavage protection assays* wurde untersucht, ob das TFO4 die *triple-helix* sequenzspezifisch auf makromolekularer DNA ausbilden kann. Dafür wurde ein 150mer PCR-Produkt hergestellt, das eine FokI-Bindestelle trägt. Das Restriktionsenzym FokI bindet GGATG, spaltet aber 9 bp im oberen Strang und 13 bp im unteren Strang *downstream* von der Bindestelle entfernt. Im Experiment wurde diese Spaltregion von dem TFO4 durch Ausbildung einer *triple-helix* gebunden. Dadurch wurde trotz möglicher FokI-Bindung die Spaltung verhindert (siehe Abb. 3-7). Im Gegensatz dazu nahm ein unspezifisches TFO3 keinen Einfluss auf die Spaltreaktion, obwohl es unter gleichen Bedingungen mit dem PCR-Substrat vorinkubiert wurde (1 h, 37 °C) (Abb. 3-8).

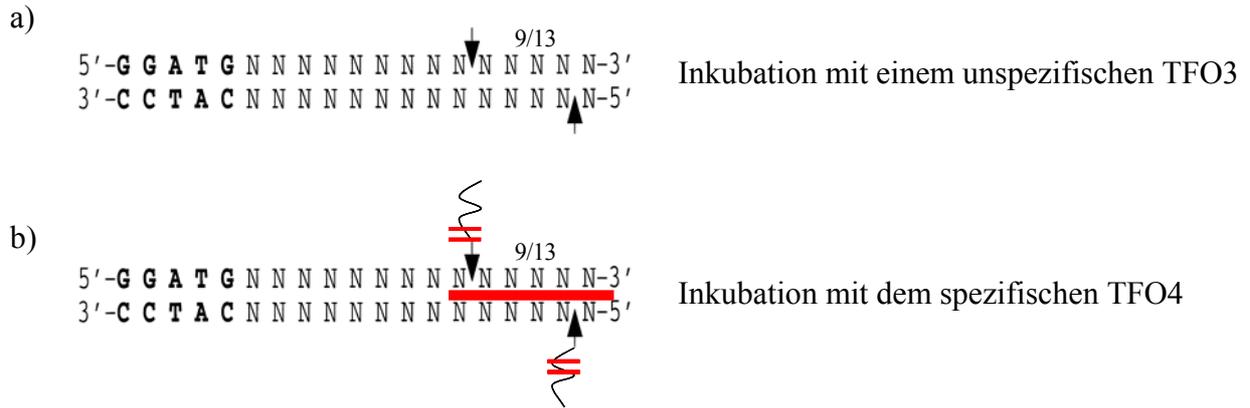


Abbildung 3-7: Schema des *cleavage protection assays*: a) Das Restriktionsenzym FokI bindet an die GGATG-Sequenz, spaltet aber 9 bp im oberen Strang und 13 bp im unteren Strang downstream von der Bindestelle entfernt (NNNN entspricht jeder beliebigen Base und ist im angegebenen Fall für die Bindung des TFO4 spezifisch, d.h. GAGAGAGAGAAAAAAA). Die Spaltung kann nach Inkubation mit dem unspezifischen TFO3 ungehindert stattfinden. B) Nach Inkubation mit dem spezifischen TFO4 bindet das TFO4 an die FokI-Spaltstelle und verhindert so die Spaltung durch das Restriktionsenzym.

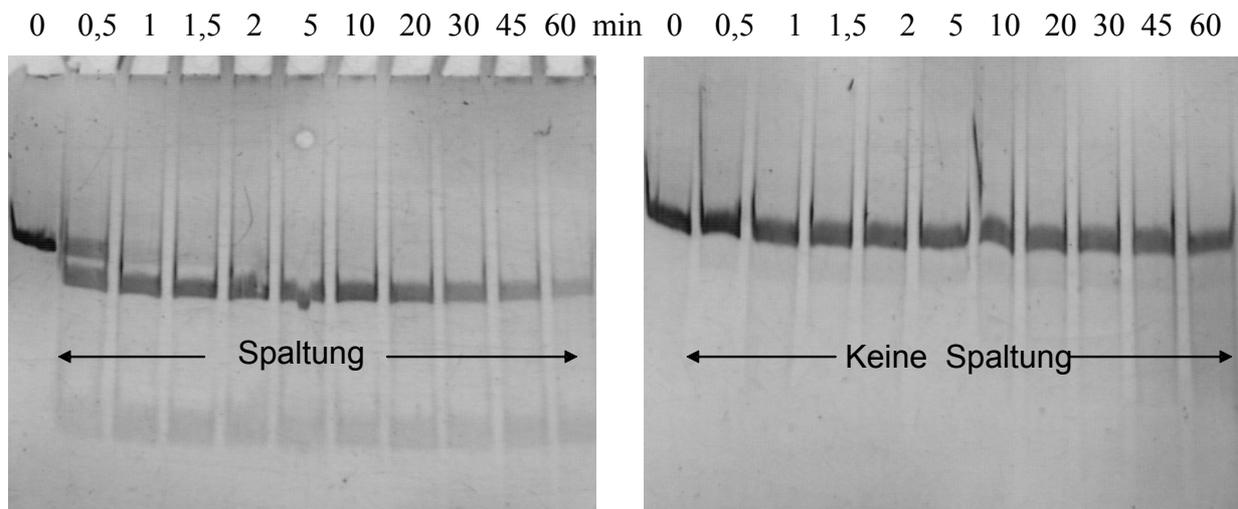


Abbildung 3-8: *Cleavage protection assay*. Das 6 % Polyacrylamidgel wurde mit Ethidiumbromid-gefärbt: Spaltkinetik von 1 μ M PCR-Produkt (150mer) nach Vorinkubation mit 10 μ M unspezifischem TFO3 (links) oder 10 μ M spezifischem modifiziertem TFO4 (rechts), bei der die Kinetik durch Zugabe von FokI, 10 mM $MgCl_2$ gestartet wurde.

3.2 Konstruktion und Herstellung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates

3.2.1 Herstellung der scPvuIIH₆G₄C Variante

Um das TFO-scPvuII-Heterokonjugat herstellen zu können, musste zuerst die scPvuIIH₆G₄C Variante von PvuII exprimiert und über eine Affinitätschromatographie-Säule aufgereinigt

werden. Mit Hilfe eines SDS-Gels wurden die Ausbeute und die Reinheit der Produkte der Proteinaufreinigung analysiert.

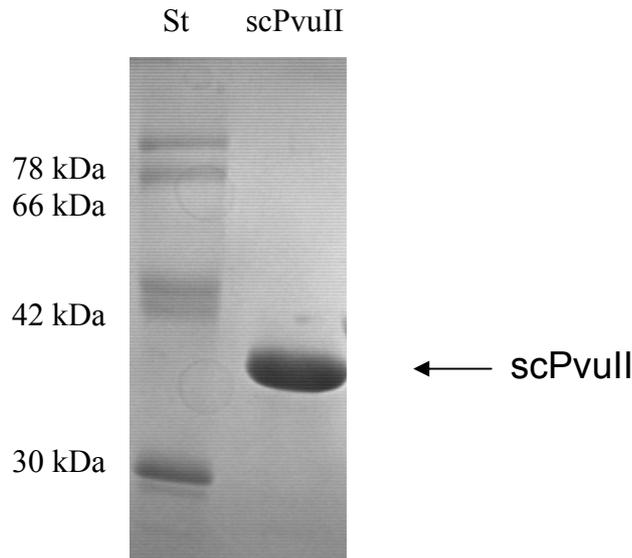


Abbildung 3-9: Gelbild des Produkts nach Aufreinigung der scPvuII; 15 % SDS-Page, Coomassie-Färbung, St = Merk IV-Standard

Abbildung 3-9 verdeutlicht, dass die scPvuIIH₆G₄C-Variante mit guter Ausbeute exprimiert und fast 100 %iger Reinheit gereinigt werden konnte. Aus einer 500 ml-Kultur konnten ca. 3,8 µg nahezu homogenes Protein erhalten werden.

3.2.2 Analyse der scPvuIIH₆G₄C Variante mittels Fluoreszenzanisotropie-Messung

An die scPvuII wurden C-terminal ein His-tag, vier Glycinreste und ein Cysteinrest durch Klonierung angefügt. Mit Anisotropiemessung wurde die scPvuIIH₆G₄C Variante hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an ein spezifisches DNA-Substrat mit und ohne Kofaktor untersucht. Dabei wurde die scPvuIIH₆G₄C Variante in einem Titrationsansatz zu einem doppelsträngigen fluoreszenzmarkierten Substrat gegeben. Dieses Substrat hat in Lösung eine definierte Mobilität, die in Abhängigkeit von Größe, Form und Masse steht und gemessen werden kann. Bindet ein Protein an dieses Substrat, erhöht sich dessen Masse, wodurch sich die Mobilität verringert. Aus dieser Veränderung kann man somit auf die Bindungseigenschaften der Proteine in Lösung schließen.

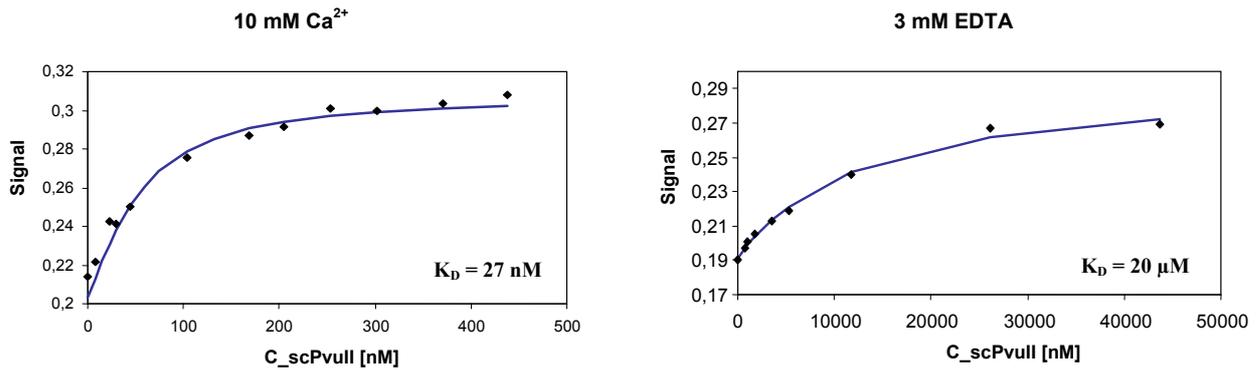


Abbildung 3-10: Fluoreszenzanisotropiemessung des HEX-markierten DNA-Substrates, welches mit unterschiedlichen Mengen scPvuII titriert wird. Die Bindung von scPvuII an sein spezifisches Substrat wird in Gegenwart von 10 mM Ca^{2+} (links; $K_D = 27 \text{ nM}$) oder 3 mM EDTA (rechts; $K_D = 20 \mu\text{M}$; jeweils durch nicht-lineare Kurvenanpassung ermittelt); C_{scPvuII} = Konzentration des Proteins

Abbildung 3-10 zeigt deutlich, dass mit Ca^{2+} eine starke Bindung zur PvuII-Spaltstelle erfolgt, während ohne Kofaktor nur eine schwache Bindung zu beobachten ist. Der K_D -Wert der scPvuIIH₆G₄C-Variante von 27 nM ist 200fach erhöht gegenüber der scPvuII Variante ohne His-tag. Deren Bindungsverhalten wurde allerdings mit einem *electrophoretic mobility gel shift* auf einem 42 bp Substrat untersucht [Simoncsits et al., 2001]. Die Fluoreszenzanisotropiemessungen zeigten, dass scPvuII durch die angefügten 6 Histidine, die 4 Glycine und das Cystein in seinen Bindungseigenschaften zwar beeinflusst wird, das Enzym aber noch ausreichende Funktionalität besitzt, um für weiterführende Experimente verwendet zu werden. Deshalb konnte die scPvuIIH₆G₄C-Variante für die adressierten Spaltexperimente eingesetzt werden.

3.2.3 Herstellung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates

Um eine adressierte Restriktionsendonuklease zu erhalten, wurde die scPvuIIH₆G₄C Variante in einer Crosslinkreaktion an das TFO4 gekoppelt. Zuerst wurde das TFO mit dem bifunktionellen Crosslinker GMBS (= N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimid-ester) verknüpft, indem eine Amidbindung zwischen der 5'-NH₂-Gruppe des TFOs mit der Estergruppe des Crosslinkers gebildet wurde. Dabei wurde eine reaktive Maleimidgruppe auf das TFO übertragen. Die NH₂-Gruppe des TFOs war mit dem TFO über 6, bzw. 12 Methylengruppen verbunden, so dass daraus zwei unterschiedliche Linker-Längen zwischen TFO und scPvuII im hergestellten TFO_{C6}-scPvuII- bzw. TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat resultierten. Die Maleimid-Gruppe des GMBS reagiert in einer zweiten Reaktion mit dem C-terminalen (einzigem) Cystein

der scPvuIIH₆G₄C- Variante. Beide Reaktionen sind in Abbildung 3-11 schematisch dargestellt und wurden in Kapitel 2.4.7 beschrieben.

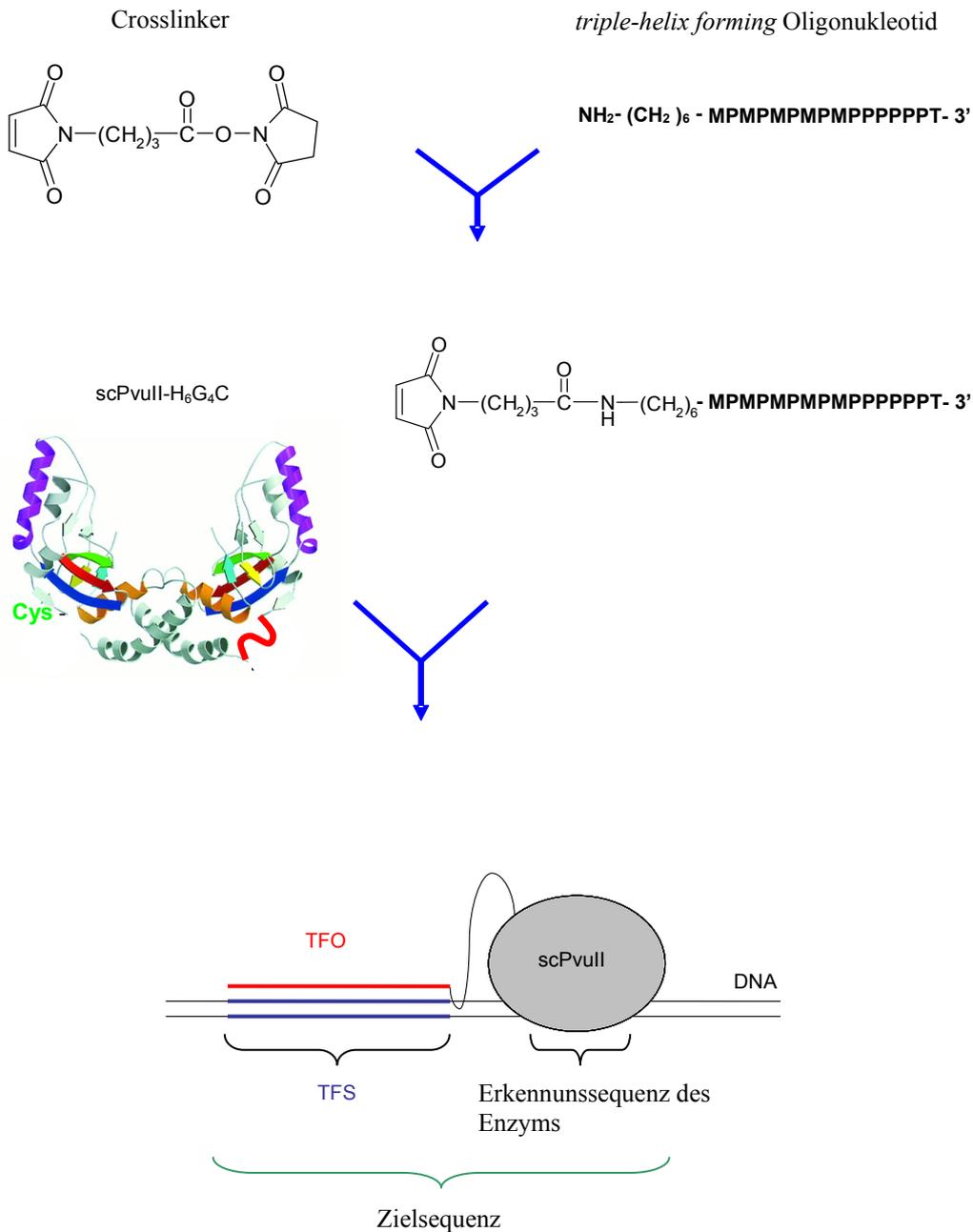


Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktionen zur Herstellung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates. Zuerst wird das modifizierte Oligonukleotid mit dem bifunktionellen Crosslinker über Bildung einer Amidbindung gekoppelt. Dieses Heterokonjugat trägt eine reaktive Maleimidgruppe, die mit dem Cystein der scPvuIIH₆G₄C-Variante reagiert, um das funktionelle TFO-scPvuII-Heterokonjugat zu bilden. Dieses Konstrukt soll anschließend in der Lage sein, eine bipartite Erkennungssequenz zu erkennen und zu binden. TFS = *triple-helix forming site*

Nach der Crosslinkreaktion ist das Molekulargewicht der scPvuII durch das angehängte TFO erhöht, so dass das TFO-scPvuII Konstrukt in einem SDS-PAGE-Gel langsamer läuft und somit von der freien scPvuII deutlich unterschieden werden kann (Abb. 3-12).

Dabei kann in Abbildung 3-12 exemplarisch gezeigt werden, dass die Ausbeute der Kopplungsreaktion mehr als 70 % beträgt.

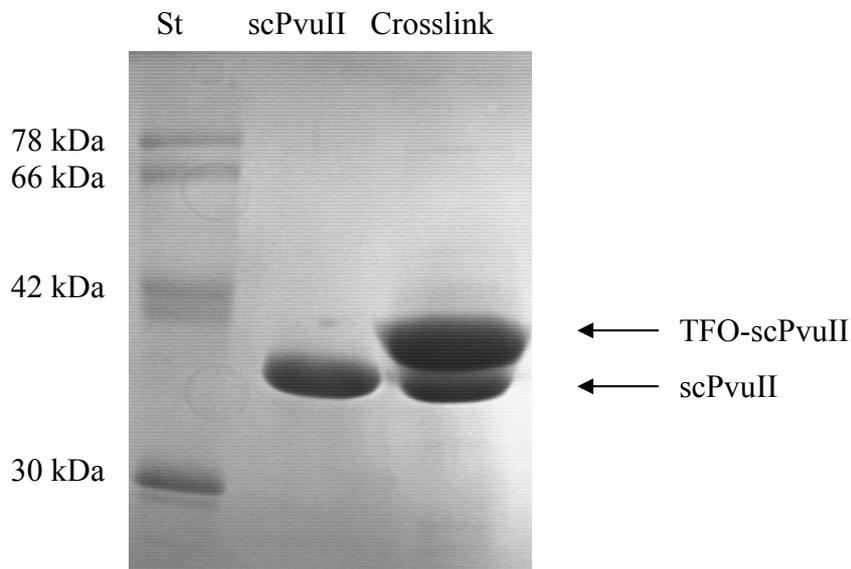


Abbildung 3-12: Das Gelbild der freien scPvuII und der Crosslinkreaktion mit freier scPvuII und TFO-scPvuII-Heterokonjugat (Crosslink); 15 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; St = Protein-Standard IV (Merck)

Wie Abbildung 3-12 zeigt, ist nach der Crosslinkreaktion eine Restmenge scPvuII vorhanden, die nicht an das TFO gekoppelt ist. Dieses freie Protein musste entfernt werden, damit keine unadressierte Spaltung die adressierte Spaltung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates überlagert. Diese Abtrennung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 3-13). Dabei ist das Säulenmaterial positiv geladen, so dass das negativ geladene Phosphatrückgrates des TFOs des TFO-scPvuII-Heterokonjugates daran binden kann. Die Elution erfolgte mit den negativ geladenen Cl^- Ionen des NaCl , wobei das Cl^- das TFO von der Säule kompetitiv verdrängt (siehe Kapitel 2.4.7.1).

Für die Aufreinigung musste die Konzentration des Reaktionsansatzes auf maximal $1 \mu\text{M}$ verdünnt werden, um eine Aggregation von scPvuII und TFO-scPvuII-Heterokonjugat zu vermeiden. Mit einem aufsteigenden NaCl -Gradienten wurde die Säule gewaschen und das TFO-scPvuII-Heterokonjugat bei 350 mM bis 370 mM NaCl eluiert. Das freie scPvuII eluierte im Durchlauf.

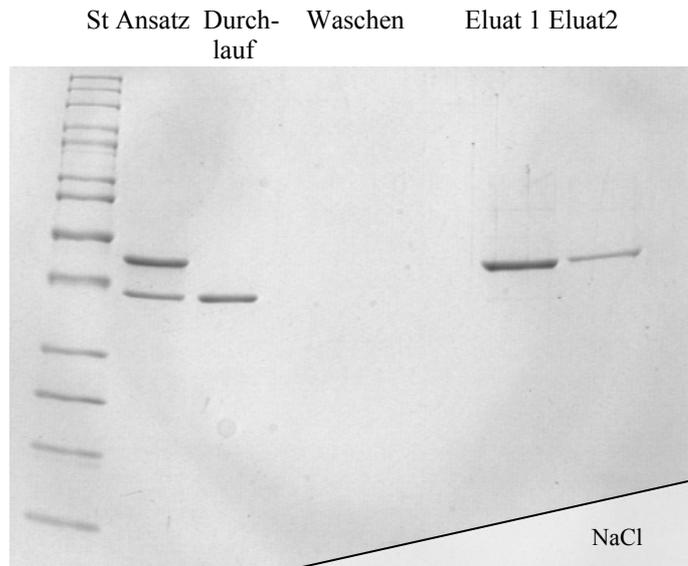


Abbildung 3-13: SDS-PAGE-Analyse der TFO-scPvuII Aufreinigung über eine DE52-Anionenaustauschchromatographie in 100 mM Tris-HCl, pH 7,2, 3 mM EDTA; Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten: 100 mM NaCl – 400 mM NaCl; das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und auf einem 15 % SDS-PAGE-Gel analysiert. Zum Nachweis wurde das Gel mit sensitiver kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt.

Das SDS-PAGE-Gel in Abbildung 3-13 zeigt, dass die freie scPvuII vom TFO-scPvuII-Heterokonjugat vollständig abgetrennt werden konnte. Spaltaktivität und Spezifität dieses Heterokonjugates wurden in Spaltexperimenten überprüft (siehe Kapitel 3.2.4. und 3.3).

3.2.4 Kontrollspaltung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates

Das aufgereinigte TFO-scPvuII-Heterokonjugat wurde in einem Spaltexperiment hinsichtlich seiner nukleolytischen Aktivität überprüft. Es wurden ein langes, nicht-adressiertes 478mer und ein kurzes, adressiertes 239mer PCR-Produkt als Substrate eingesetzt. Beide haben eine PvuII-Spaltstelle und im Überlappungsbereich die gleiche Sequenz, wobei das 239mer entsprechend kürzer ist und eine *triple-helix*-Bindungsstelle neben der PvuII-Spaltstelle trägt. Die Spaltung erfolgte ohne Vorinkubation von TFO-scPvuII-Heterokonjugat, so dass keine *triple-helix* ausgebildet werden konnte, da die *triple-helix* extrem langsam gebildet wird. Durch Zugabe von 10 mM MgCl₂ wurde die Spaltung gestartet. Abbildung 3-14 zeigt, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat die gleiche Spaltaktivität auf beiden Substraten zeigt, sowohl in Einzelspaltexperimenten als auch in Konkurrenz.

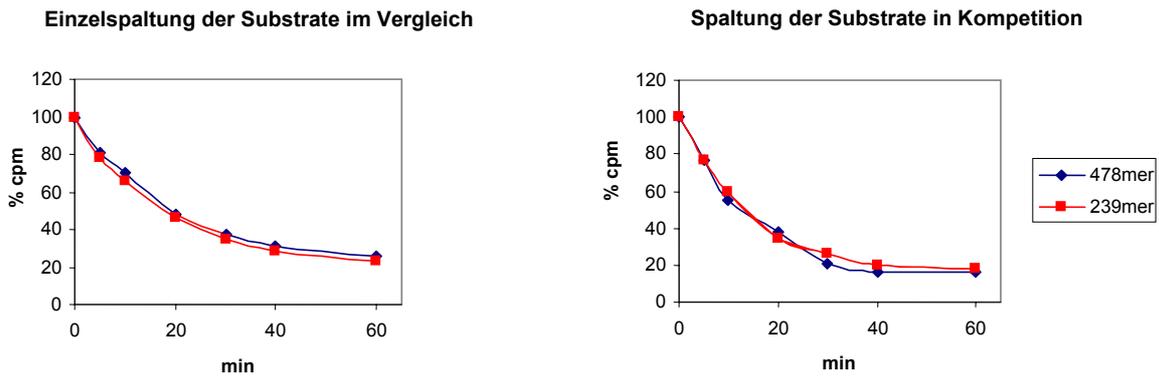


Abbildung 3-14: Spaltung von 45 nM adressiertem PCR-Substrat mit *triple-helix* Bindungsstelle und 45 nM nicht-adressiertem PCR-Substrat ohne *triple-helix*-Bindungsstelle (478mer); die Spaltreaktion wird direkt ohne Vorinkubation von TFO-scPvuII-Heterokonjugat und Substrat gestartet, so dass noch keine *triple-helix* ausgebildet werden konnte. Die Spaltung wird durch Zugabe von 10 mM MgCl₂ gestartet.

Dieses Kontrollexperiment zeigte, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat auf beiden Substraten die volle Spaltaktivität zeigt. Das TFO-scPvuII-Heterokonjugat konnte danach in der adressierten Spaltung untersucht werden.

3.3 Adressierte Spaltung durch das TFO-scPvuII-Heterokonjugat

3.3.1 Adressierte Spaltung von PCR-Produkten

In den adressierten Spaltexperimenten erwartet man, dass das TFO des TFO-scPvuII-Heterokonjugats in Abwesenheit von Mg²⁺, des für die Spaltung essentiellen Kofaktors von PvuII, spezifisch an solche DNA-Sequenzen bindet, an denen eine stabile *triple-helix* ausgebildet werden kann. Befindet sich diese *triple-helix* Bindungsstelle in der Nähe einer PvuII-Spaltstelle, so wird diese Spaltstelle nach Zugabe des Kofaktors adressiert gespalten. Andere PvuII-Spaltstellen ohne *triple-helix* Bindungsstelle sollten nicht gespalten werden.

In den Experimenten zur adressierten Spaltung wurden ein nicht-adressiertes 478mer und ein adressiertes 239mer PCR-Substrat in Konkurrenz gespalten. Dafür wurde das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat mit den Substraten ohne Kofaktor für 12 h bei Raumtemperatur vorinkubiert. Es wurden äquimolare Mengen TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat und beide Substrate in einer Reaktion eingesetzt, um eine stöchiometrische Bindung des TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugats an die *triple-helix* Bindungsstelle zu erhalten. Die Spaltung wurde nach Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der verschiedenen Mengen MgCl₂ enthielt, gestartet.

Abbildung 3-15 zeigt, dass die Spaltgeschwindigkeit des adressierten Substrates sehr hoch war und sich trotz unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentrationen nicht wesentlich veränderte. Die Spaltgeschwindigkeit des nicht-adressierten Substrates nahm mit abnehmender $MgCl_2$ -Konzentration ab. Durch Analyse der Autoradiogramme konnte eine Geschwindigkeitskonstante für jedes Substrat mit monoexponentieller Kurvenanpassung berechnet werden.

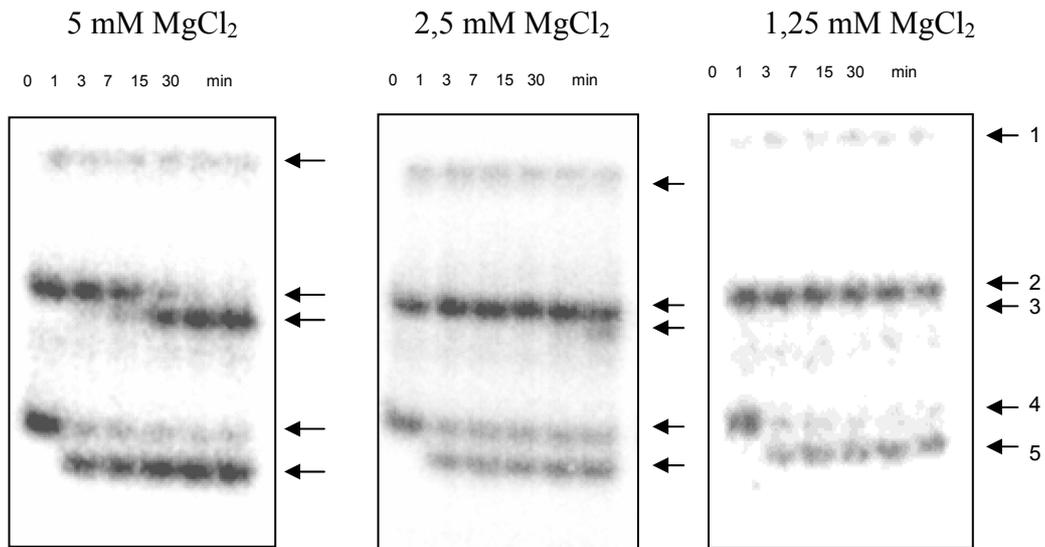
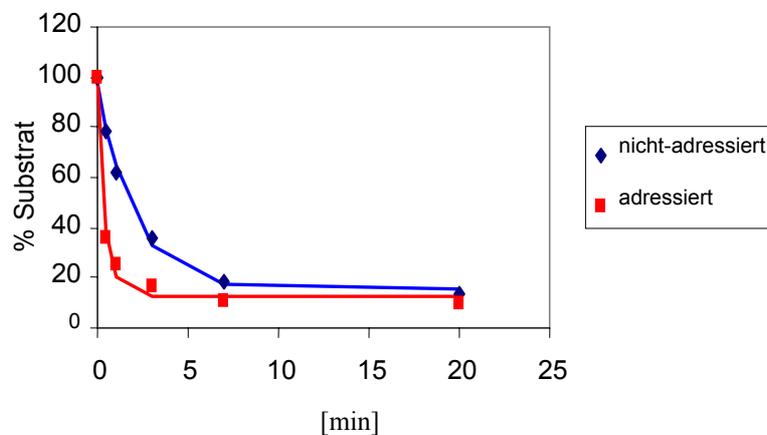
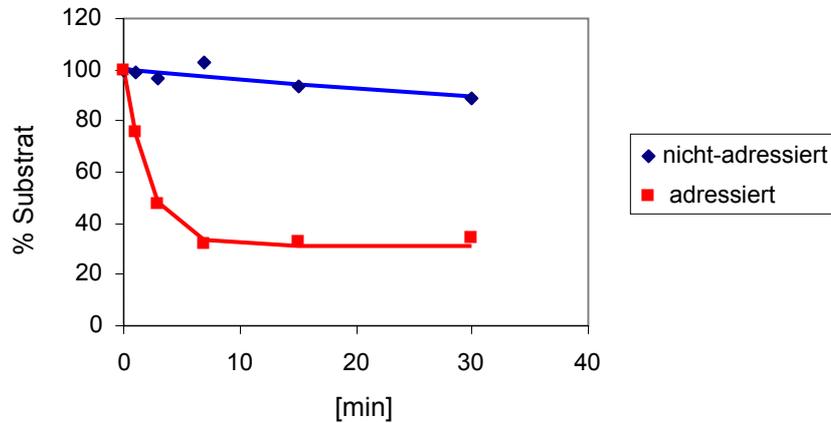


Abbildung 3-15: Autoradiogramm der adressierten Spaltung in Konkurrenz von adressiertem Substrat (4) und nicht-adressiertem Substrat (2) bei unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen; (3) Spaltprodukt des nicht-adressierten Substrates, (5) Spaltprodukt des adressierten Substrates, (1) Geltasche

adressierte vs. nicht-adressierte Spaltung bei 5 mM $MgCl_2$



adressierte vs. nicht-adressierte Spaltung bei 2,5 mM MgCl₂



adressierte vs. nicht-adressierte Spaltung bei 1,25 mM MgCl₂

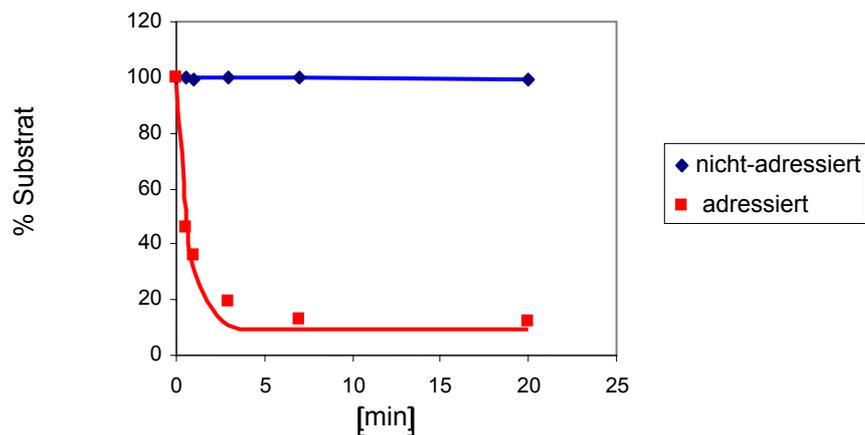


Abbildung 3-16: Spaltung von 45 nM adressiertem PCR-Substrat mit *triple-helix* Bindungsstelle (der Abstand zwischen TFS und PvuII-Spaltstelle beträgt 9 bp) und 45 nM nicht-adressiertem PCR-Substrat ohne TFS durch 45 nM TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat (C12-Linker) in Kompetiton. Die Spaltung wurde nach Vorinkubation (für 12 h bei Raumtemperatur) durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer mit jeweils unterschiedlichen Mengen MgCl₂ (5 mM, 2,5 mM und 1,25 mM) gestartet; a) Autoradiogram des 12 %igen Polyacrylamid-Gels, auf dem die Spaltreaktionen untersucht wurden; b) Analyse der Spaltung und Kurvenanpassung zur Bestimmung der Spaltgeschwindigkeitskonstante *k*

Abbildung 3-16 zeigt, dass das adressierte Substrat nicht zu 100 % gespalten wurde, obwohl äquimolare Mengen vom TFO-scPvuII-Heterokonjugat und der zwei Substrate eingesetzt wurden. Abbildung 3-17 zeigt, dass das adressierte Substrat nur zu 60 % gespalten wurde. Bei diesem Experiment wurden das TFO-scPvuII-Heterokonjugat und das adressierte Substrat im Verhältnis 1 : 2 eingesetzt und damit kann man aus dem Ergebnis schließen, dass die Produktmenge von der relativen Menge eingesetztem aktiven TFO-scPvuII-Heterokonjugat abhängt.

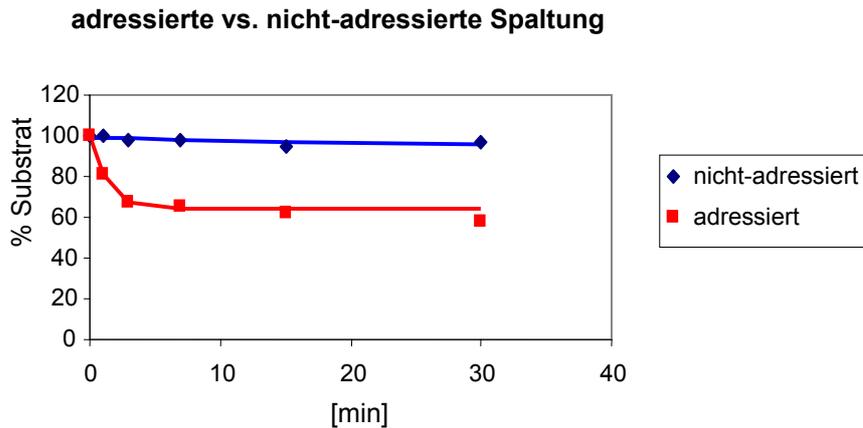


Abbildung 3-17: Produktmengenanalyse einer adressierten Spaltung: 45 nM nicht-adressiertes Substrat, 45 nM adressiertes Substrat mit TFS (Abstand zwischen TFS (*triple-helix forming site*) und PvuII-Spaltstelle beträgt 9 bp) und 22 nM TFO-scPvuII-Heterokonjugat (C12 – Linker) nach Vorinkubation für 12 h bei Raumtemperatur; die Spaltung wurde mit 1,25 mM MgCl₂ gestartet.

Die Spaltkonstanten werden in Abbildung 3-19 verglichen. Die Spaltpräferenzen für das adressierte Substrat (definiert als $k_{\text{adressiert}}/k_{\text{nicht-adressiert}}$) sind in Tabelle 3.3.1-1 und Tabelle 3.3.1-2 zusammengefasst und zeigen, dass bei niedrigen MgCl₂-Konzentrationen das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat sehr spezifisch das adressierte Substrat mit TFS (*triple-helix forming site*) spaltet. Diese Mg²⁺-Abhängigkeit erklärt sich, da DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme nur erfolgen kann, wenn ein Komplex aus DNA-Restriktionsenzym-Mg²⁺ gebildet wurde. ScPvuII benötigt zur DNA-Spaltung vier Mg²⁺-Ionen [Conlan and Dupureur, 2002; Spyridaki et al., 2003], so dass im PvuII-Spaltpuffer 10 mM MgCl₂ für optimale Spaltbedingungen von PvuII sorgen. Bei niedrigeren Mg²⁺-Konzentration ist die Spaltgeschwindigkeit von PvuII reduziert. In den adressierten Spaltexperimenten war das Enzym durch das TFO permanent an die PvuII-Spaltstelle gebunden, wodurch die Konzentration von DNA-Restriktionsenzym-Komplex stark erhöht wurde und somit effiziente Spaltbedingungen selbst bei niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen gewährleistet waren.

Im eben beschriebenen Spaltexperiment betrug der Abstand von TFS und PvuII-Spaltstelle auf dem adressierten 239mer PCR-Substrat 9 bp. Da angenommen wurde, dass der Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS die adressierte Spaltung beeinflussen kann, wurden fünf zusätzliche adressierte 239mer Substrate hergestellt, deren Abstände zwischen TFS und PvuII-Spaltstelle 3 bp, 5 bp, 7 bp, 11 bp, 13 bp betrug (Abb. 3-16).

Nicht-adressiertes Spaltsubstrat ohne TFS:



Adressierte Spaltsubstrate mit TFS in unterschiedlichen Abständen (3bp, 5bp, 7bp, 9bp, 11bp, 13bp) zur PvuII-Spaltstelle:

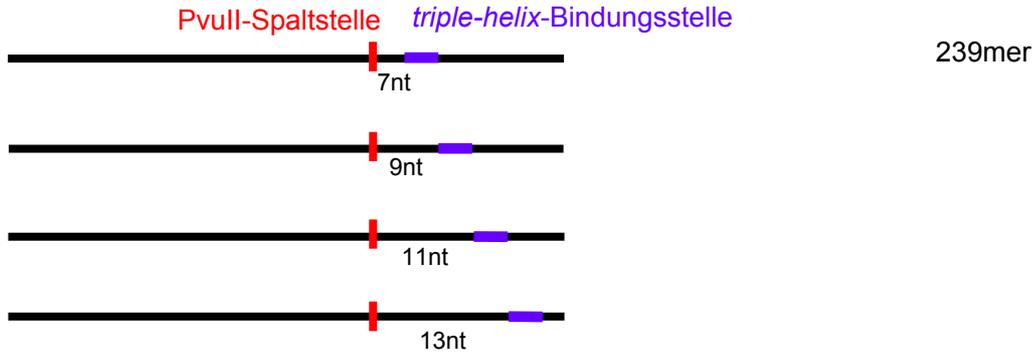
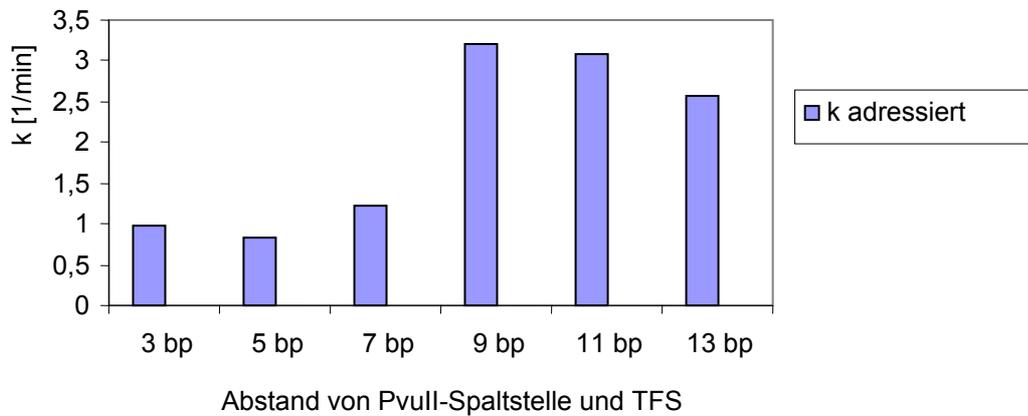


Abbildung 3-18: Schema der PCR-Spaltsubstrate: das 478mer nicht-adressierte PCR-Substrat hat eine PvuII-Spaltstelle, aber keine TFS; die 239mer adressierten PCR-Substrate haben eine PvuII-Spaltstelle und in verschiedenen Abständen eine TFS; das adressierte und nicht-adressierte Substrat unterscheiden sich in der Länge, damit sie in Kompetitionsspaltextperimenten unterschieden werden können.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Linkerlänge zwischen TFO und scPvuII einen Einfluss auf die adressierte Spaltung hat. Deshalb wurden jeweils zwei TFO-scPvuII-Heterokonjugate eingesetzt – TFO_{C6}-scPvuII mit C6-Linker (6-Methylengruppen) und TFO_{C12}-scPvuII mit einem doppelt so langen C12-Linker (12-Methylengruppen). In adressierten Spaltexperimenten wurde das Optimum vom Abstand zwischen TFS und PvuII-Spaltstelle und der Linkerlänge in Kompetitonsspaltextperimenten mit dem nicht-adressierten 478mer PCR-Substrat untersucht. Die Spaltung wurde nach Präinkubation der Substrate mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat für 12 h bei Raumtemperatur durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer mit 1,25 mM MgCl₂ gestartet, da vorausgegangene Experimente gezeigt hatten, dass bei dieser Konzentration das adressierte Substrat mit größter Präferenz gespalten wurde.

In diesen Experimenten konnte die Spaltgeschwindigkeit nicht-adressierten Substrates nicht exakt bestimmt werden, da sie sich am Rande des Detektionslimits befand. Deshalb wurde sie als Mittelwert aller gemessenen $k_{\text{nicht-adressiert}}$ -Werte abgeschätzt. Für das TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat ergab sich somit ein $k_{\text{nicht-adressiert}}$ von 0,002 min⁻¹ und für das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat ein $k_{\text{nicht-adressiert}}$ von 0,001 min⁻¹ (Abbildung 3-17; Tabelle 3.3.1-1).

k-Werte für TFO_{C12}-scPvuII-Spaltung verschiedener Substrate



k-Werte für TFO_{C6}-scPvuII-Spaltung verschiedener Substrate

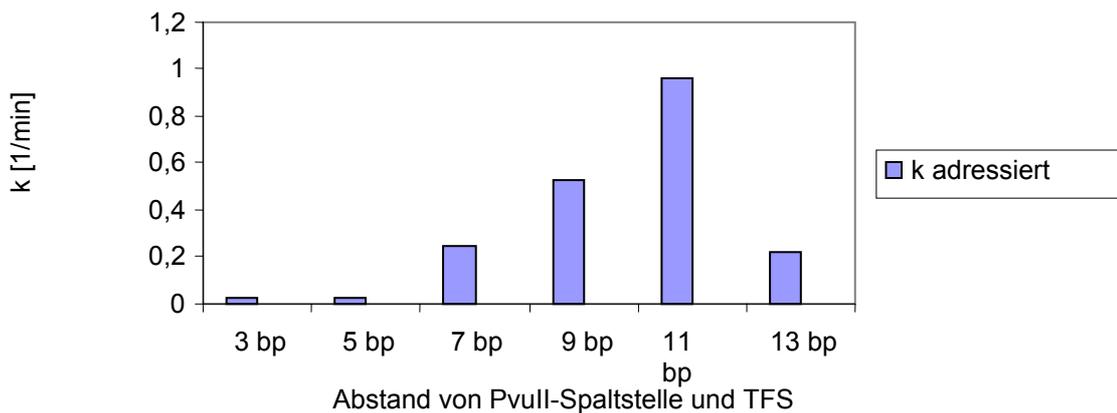


Abbildung 3-19: Spaltgeschwindigkeitskonstanten für das adressierte Substrat und das nicht-adressierte Substrat, die in Kompetitionsexperimenten für zwei TFO-scPvuII-Heterokonjugate mit C12- bzw. C6-Linker gemessen werden; Es wurden die Spaltgeschwindigkeitskonstanten für verschiedene adressierte Substrate mit unterschiedlichem Abstand zwischen TFS und PvuII Spaltstelle bestimmt.

Vergleicht man die Spaltgeschwindigkeitskonstanten des TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugates auf den verschiedenen Substraten, so sieht man, dass das adressierte Substrat mit hoher Spaltgeschwindigkeit im Gegensatz zum nicht-adressierten Substrat gespalten wird, wobei das adressierte Substrat mit 9 bp und 11 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS am schnellsten gespalten wird (9 bp: $k_{9 \text{ bp}_{C12}} = 3,2 \text{ min}^{-1}$ und 11 bp: $k_{11 \text{ bp}_{C12}} = 3,1 \text{ min}^{-1}$). Diese Spaltgeschwindigkeitskonstanten sind 6- bzw. 3-fach größer als die Spaltgeschwindigkeitskonstanten des TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugates ($k_{9 \text{ bp}} = 0,5 \text{ min}^{-1}$ bzw. $k_{11 \text{ bp}} = 1 \text{ min}^{-1}$). Aus diesen Daten kann man die Spaltpräferenz durch Bildung des Quotienten aus $k_{\text{adressiert}}/k_{\text{nicht-adressiert}}$ berechnen. Für die adressierten Substrate mit 9 bp und 11 bp Abstand zwischen PvuII-

Spaltstelle und TFS ergeben sich deshalb Spaltpräferenzen des adressierten Substrates von über 1500-fach und 1400-fach für das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat, bzw. 450-fach und 800-fach für das TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat gegenüber dem nicht-adressierten Substrat.

Die Geschwindigkeitskonstanten mit denen das TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat die adressierten Substrate spaltet, deren Abstände zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS kürzer sind als 7 bp, nehmen kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu spaltet das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat, mit dem längeren C12-Linker diese Substrate wesentlich besser, und zwar mit Spaltgeschwindigkeitskonstanten, die der größten Spaltgeschwindigkeitskonstanten des TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugates bei einem Abstand von 11 bp entsprechen ($k_{11 \text{ bp}_C6} = 1 \text{ min}^{-1}$). Das deutet darauf hin, dass der längere C12-Linker wesentlich flexibler ist als der kürzere C6-Linker und deshalb die Spaltung besser ermöglicht.

Die Spaltgeschwindigkeitskonstanten und die Spaltpräferenzen für die Spaltungen bei 1,25 mM MgCl₂ sind in Tabelle 3.3.1-1 für das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat und in Tabelle 3.3.1-2 für das TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat zusammengefasst. In diesen Tabellen werden auch die Fehlergrenzen für die Spaltgeschwindigkeitskonstanten angegeben. Diese wurden, unter Beachtung der Detektionsgrenze beim Imager aus mindestens drei Datensätzen berechnet.

In den Spaltexperimenten, die mit 5 mM bzw. 2,5 mM MgCl₂ gestartet wurden, ist die Spaltpräferenz geringer, da die Spaltgeschwindigkeit des nicht-adressierten Substrates zunimmt, so dass die präferentielle Spaltung des adressierten Substrates reduziert wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den adressierten Spaltexperimenten mit PCR-Substraten die Spaltung durch das TFO-scPvuII-Heterokonjugat bei geringer Mg⁺²-Konzentration stark an das Vorhandensein einer TFS gekoppelt ist. Die adressierte Spaltung kann mit den beiden Heterokonjugaten, TFO_{C6}-scPvuII und TFO_{C12}-scPvuII, erreicht werden. Beide Heterokonjugate spalten die adressierten Substrate mit 9 bp und 11 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS am besten, jedoch besitzt der längere C12-Linker offensichtlich mehr Flexibilität, so dass auch die adressierten Substrate mit den kürzeren und größeren Abständen vom TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat mindestens genauso gut gespalten werden, wie die adressierten Substrate mit 9 bp und 11 bp Abstand vom TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat gespalten werden.

Diese Linkerflexibilität ermöglicht eine Spaltpräferenz von über 1500-fach für das Substrat mit optimalem 9 bp Abstand gegenüber dem nicht-adressierten Substrates.

Tabelle 3.3.1-1: Spaltgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{adressiert}}$ und Spaltpräferenz für die adressierte Spaltung in Kompetiton zwischen nicht-adressiertem PCR-Substrat ohne TFS und adressiertem PCR-Substrat mit TFS; die TFS befindet sich in verschiedenen Abständen zur PvuII-Spaltstelle (3 bp, 5 bp, 7 bp, 9 bp, 11 bp, 13 bp). Die Spaltung wurde nach Vorinkubation für 12 h bei Raumtemperatur mit dem TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat mit PvuII-Spaltpuffer, der 1,25 mM MgCl₂ enthält, gestartet.

| Abstand von PvuII-Spaltstelle & TFS | C12_k adressiert [min ⁻¹] | Fehlergrenze (+/-) % | Spaltpräferenz |
|-------------------------------------|---|----------------------|----------------|
| 3 bp | 1,0 | 5 | 440-fach |
| 5 bp | 0,8 | 6 | 360-fach |
| 7 bp | 1,2 | 7 | 540-fach |
| 9 bp | 3,2 | 9 | 1410-fach |
| 11 bp | 3,1 | 13 | 1360-fach |
| 13 bp | 2,6 | 10 | 1140-fach |

Tabelle 3.3.1-2: Spaltgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{adressiert}}$ und Spaltpräferenz für die adressierte Spaltung in Kompetiton zwischen nicht-adressiertem PCR-Substrat ohne TFS und adressiertem PCR-Substrat mit TFS; die TFS befindet sich in verschiedenen Abständen zur PvuII-Spaltstelle (3 bp, 5 bp, 7 bp, 9 bp, 11 bp, 13 bp). Die Spaltung wurde nach Vorinkubation für 12 h bei Raumtemperatur mit dem TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat mit PvuII-Spaltpuffer, der 1,25 mM MgCl₂ enthält, gestartet.

| Abstand von PvuII-Spaltstelle & TFS | C6_k adressiert [min ⁻¹] | Fehlergrenze (+/-) % | Spaltpräferenz |
|-------------------------------------|--|----------------------|----------------|
| 3 bp | 0.03 | 7 | 20-fach |
| 5 bp | 0.03 | 17 | 20-fach |
| 7 bp | 0.3 | 7 | 210-fach |
| 9 bp | 0.5 | 6 | 450-fach |
| 11 bp | 1.0 | 15 | 820-fach |
| 13 bp | 0.2 | 10 | 190-fach |

3.3.1.1 Adressierte Spaltung in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Bei einer hohen Ionenstärke im Spaltansatz kann PvuII die DNA nicht mehr binden und demzufolge auch nicht mehr spalten, da die elektrostatische Abschirmung eine Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat verhindert.

Im Experiment sollte untersucht werden, ob die Ionenstärke einen Einfluss auf die Spaltpräferenz für das adressierte Substrat hat. Dafür wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, in denen das adressierte Substrat mit 9 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS und das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat eingesetzt wurden. Die Spaltreaktion wurde nach 12-stündiger Vorinkubation des Substrates mit dem Heterokonjugat bei Raumtemperatur durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 1,25 mM bzw. 2,5 mM MgCl₂, sowie jeweils unterschiedliche Konzentrationen NaCl (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM 100 mM) enthielt,

gestartet. Steigende Mengen NaCl bis 20 mM beeinflussten die Spaltaktivität des TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugates nicht. Wurden die Spaltexperimente mit 1,25 mM MgCl₂ und 30 mM NaCl gestartet, so reduzierte sich die Spaltgeschwindigkeit um die Hälfte. Bei einem Anteil von 100 mM NaCl wurde die Spaltaktivität sogar 6-fach reduziert. Wurde die Spaltreaktion mit PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthielt, gestartet, so wurde die Spaltgeschwindigkeit 3-fach reduziert (Tabelle 3.3.1-3). Die Abnahme der Spaltgeschwindigkeit durch Erhöhung der Salzkonzentration konnte deshalb z.T. durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentration kompensiert werden.

Tabelle 3.3.1-3: Spaltgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{adressiert}}$ in Konkurrenzspaltexperimenten, bei denen das adressierte Substrat mit 9 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS und das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat (C12-Linker) verwendet wurden; Die Spaltung wurde gestartet nach Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer mit steigenden Mengen NaCl und jeweils 1,25 mM bzw. 2,5 mM MgCl₂.

| NaCl [mM] | $k_{\text{adressiert_C12}}$ bei 1.25 mM MgCl ₂ [min ⁻¹] | $k_{\text{adressiert_C6}}$ bei 2.5 mM MgCl ₂ [min ⁻¹] |
|-----------|---|---|
| 0 | 3.0 | 2.9 |
| 10 | 3.0 | nd. |
| 20 | 3.0 | 2.9 |
| 30 | 1.5 | nd. |
| 50 | 1.4 | 2.1 |
| 100 | 0.5 | 1.1 |

Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen waren die Spaltgeschwindigkeiten des nicht-adressierten Substrates so niedrig, dass sie nicht detektiert werden konnten, weshalb keine Änderungen dieser Spaltgeschwindigkeit bestimmt werden konnten. Die Spaltgeschwindigkeit des adressierten Substrates nahm mit steigender Salzkonzentration ab. Doch selbst bei der höchsten NaCl-Konzentration von 100 mM konnte jedoch noch ausreichend Spaltaktivität gemessen werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass die adressierte Spaltung unter verschiedenen Bedingungen möglich ist.

3.3.2 Adressierte Spaltung von Plasmid-DNA

3.3.2.1 Adressierte Spaltung von *supercoil* Plasmid-DNA

Im folgenden Experiment sollte gezeigt werden, dass die adressierte Spaltung nicht nur bei PCR-Substraten, sondern auch bei makromolekularen Substraten, wie z.B. *supercoil* oder linearer Plasmid-DNA möglich ist. Es wurde ein Substrat-Plasmid verwendet, das vier „normale“ PvuII-Spaltstellen ohne TFS trägt. Für die adressierte Spaltung wurde eine

zusätzliche PvuII-Spaltstelle mit 9 bp entfernter TFS eingefügt. Durch Spaltung des *supercoil* Plasmids vom TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat ohne Vorinkubation, entstehen fünf Spaltfragmente mit den Längen (2689 bp, 948 bp, 870 bp, 608 bp und 441 bp). Wurde die Spaltreaktion nach 12-stündiger Vorinkubation mit äquimolaren Mengen an TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet, so entstand selbst nach sehr langer Einwirkzeit nur ein lineares Spaltprodukt (Abbildung 3-21). Dieses Ergebnis zeigt, dass die adressierte Spaltung auch auf *supercoil* Plasmid-DNA hochspezifisch ist, denn es wurde nur die adressierte PvuII-Spaltstelle gespalten und nicht die vier nicht-adressierten „normalen“ PvuII-Spaltstellen.

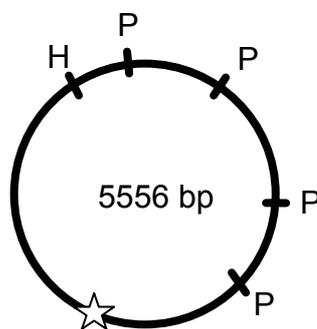


Abbildung 3-20: Schema des *supercoil* Plasmides (5556 bp) mit den vier nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen (P), der adressierten PvuII-Spaltstelle (☆) und der HindIII-Spaltstelle (H), die für die Linearisierung des Plasmids genutzt wurde (s.u.)

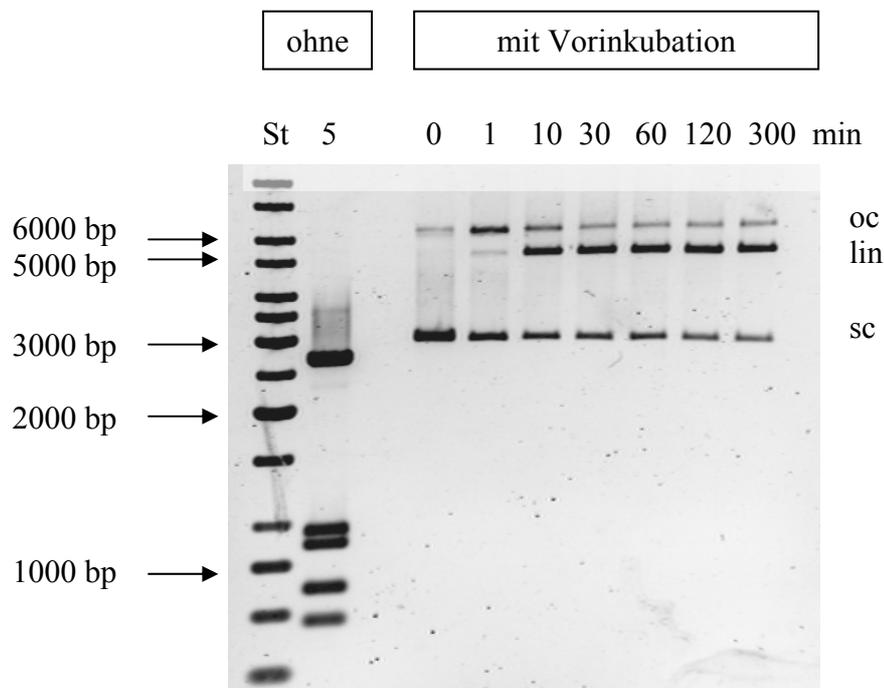


Abbildung 3-21: Adressierte Spaltung von *supercoil* Plasmid-DNA, die vier nicht-adressierte PvuII-Spaltstellen und eine adressierte PvuII-Spaltstelle mit TFS (9 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS) enthält. Die Spaltung wird nach 12-stündiger Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet. Aliquots der Reaktion wurden nach 0 min, 1 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120

min, 300 min entnommen und die Reaktion durch Zugabe von EDTA abgestoppt. Das 0,8 % Agarose-Gel wurde mit SybrGold gefärbt; Es wurde der 1 kB Standard von MBI verwendet (St); oc = *open circle*, lin = lineares Plasmid, sc = *supercoil* Plasmid

Die quantitative Analyse der Spaltung ermöglichte eine k-Wertbestimmung von $k_{\text{supercoil}}=1,4 \text{ min}^{-1}$. Das bedeutet, dass die Spaltgeschwindigkeit der *supercoil* Plasmid-DNA mit der Spaltgeschwindigkeit des PCR-Produktes unter den gleichen Reaktionsbedingungen vergleichbar ist. Die Spaltung der anderen PvuII-Spaltstellen war nicht detektierbar, so dass eine Spaltpräferenz von mehr als 1000-fach angenommen werden kann.

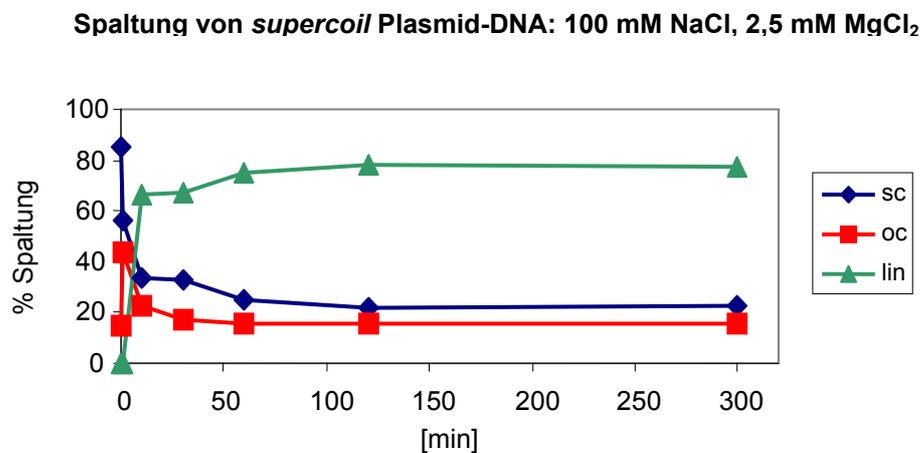


Abbildung 3-22: Quantitative Analyse der adressierten Spaltung: 40 nM *supercoil* Plasmid-DNA (sc) wird von 40 nM TFOC12-scPvuII-Heterokonjugat nach 12-stündiger Vorinkubation mit TFO-scPvuII-Heterokonjugat gespalten; die Spaltung wird gestartet durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält; $k_{\text{supercoil}}=1,4 \text{ min}^{-1}$; oc = *open circle*, lin = linear, sc = *supercoil*

Die Abbildungen 3-21 und 3-22 zeigen, dass das Substrat trotz äquimolarer Mengen TFO-scPvuII-Heterokonjugat und Plasmid nicht vollständig gespalten wurde, was daran liegen könnte, dass die eingesetzte Enzymkonzentration nicht dem tatsächlich aktiven Enzymanteil entspricht.

3.3.2.2 Adressierte Spaltung von linearer Plasmid-DNA

Um zu überprüfen, ob die adressierte Spaltung des *supercoil* Plasmides spezifisch an der adressierten PvuII-Spaltstelle mit TFS erfolgte und ob die Spaltpräferenz auch bei linearisiertem Plasmid zu beobachten ist, wurde das *supercoil* Plasmid für die adressierte Spaltung mit HindIII linearisiert. Durch Spaltung der linearen Plasmid-DNA ohne Vorinkubation vom TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat, entstehen sechs Spaltfragmente der

Längen (2288 bp, 948 bp, 870 bp, 608 bp, 441 bp und 401 bp). Wurde die Spaltung nach 12-stündiger Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet, so entstanden selbst nach sehr langer Einwirkzeit nur zwei Spaltfragmente. Analysiert man die Länge dieser Fragmente, so wird bestätigt, dass nur die adressierte PvuII-Spaltstelle gespalten wurde (Abbildung 3-24)

Auch hier konnte eine quantitative Analyse zur Bestimmung der Spaltgeschwindigkeit k_{linear} durchgeführt werden (Abbildung 3-25). Es ergab sich ein k_{linear} von $3,9 \text{ min}^{-1}$, was bedeutet, dass die Spaltgeschwindigkeitskonstante für das lineare Plasmid fast drei mal größer ist als für das *supercoil* Plasmid oder das PCR-Produkt. Da auch hier keine Spaltung der nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen detektiert werden konnte, wurde auch dieses lineare Plasmid ausschließlich adressiert gespalten, wobei die Spaltspezifität höher als 1000-fach war.



Abbildung 3-23: Schematische Darstellung des mit HindIII linearisierten Plasmides. Die Position der vier nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen (P) und der adressierten PvuII-Spaltstelle (☆) ist angegeben.

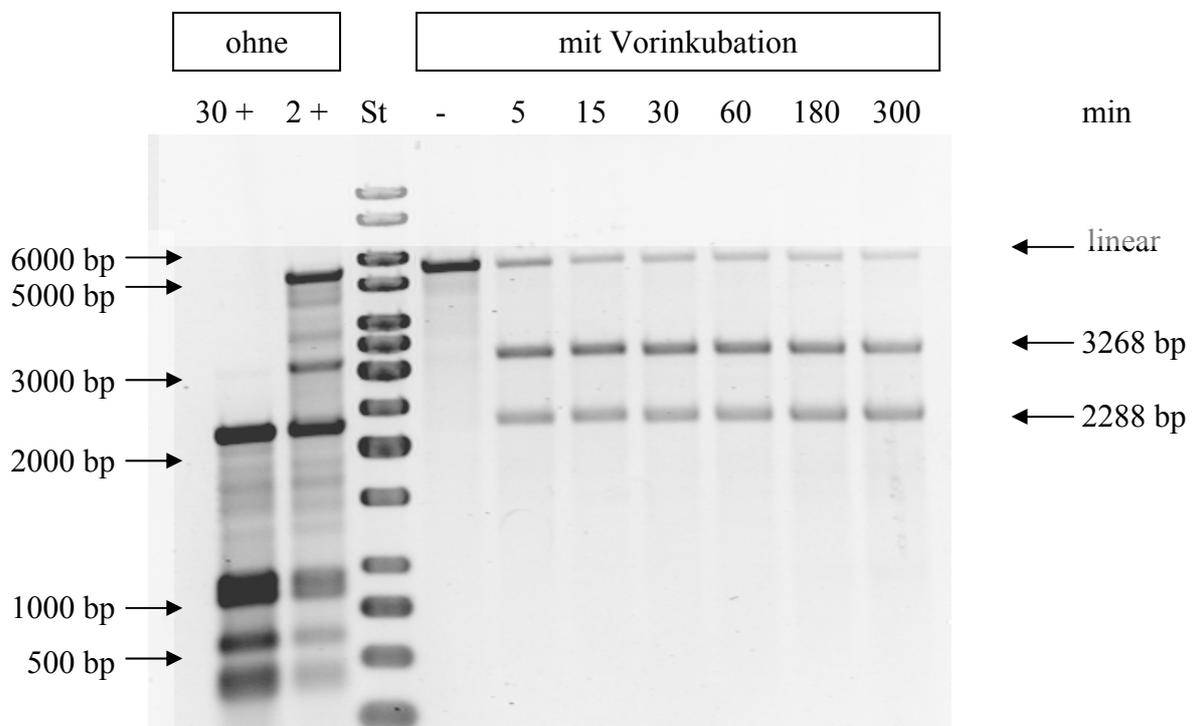


Abbildung 3-24: Adressierte Spaltung von linearer Plasmid-DNA, die vier nicht-adressierte PvuII-Spaltstellen und eine adressierte PvuII-Spaltstelle mit TFS (9 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS) enthält. Die

Spaltung wird nach 12-stündiger Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet. Aliquots der Reaktion wurden nach 0 min, 1 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 300 min entnommen und die Reaktion durch Zugabe von EDTA abgestoppt. Das 0,8 % Agarose-Gel wurde mit SybrGold gefärbt; Die Spaltung ohne Vorinkubation wurde nach 2 min (2+) bzw. 30 min (30+) mit EDTA abgestoppt; St = 1kb Standard (MBI)

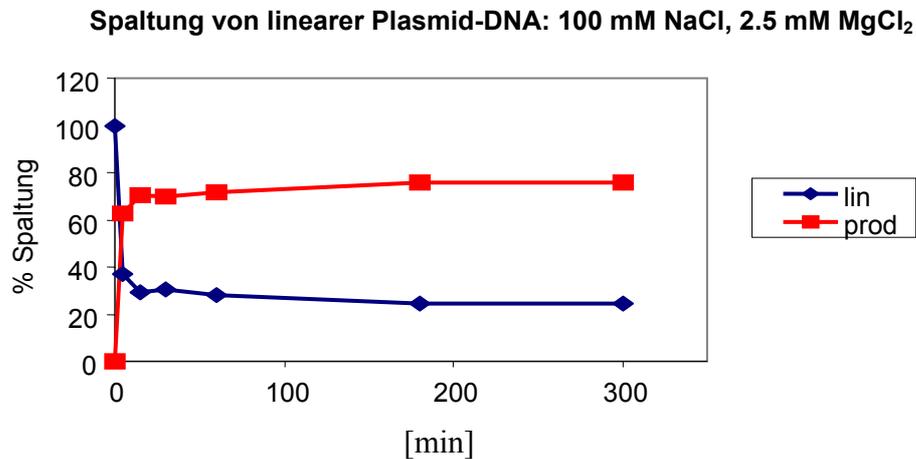


Abbildung 3-25: Quantitative Analyse der adressierten Spaltung: 40 nM lineare Plasmid-DNA wird von 40 nM TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat nach 12-stündiger Vorinkubation gespalten; die Spaltung wird durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet; $k_{\text{linear}} = 3,9 \text{min}^{-1}$; lin = lineare Substrat-DNA, prod = Spaltprodukt

Aufgrund der Ergebnisse dieser Experimente kann geschlussfolgert werden, dass das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat eine adressierte PvuII-Spaltstelle auch auf makromolekularem Substrat hoch spezifisch spaltet.

Die Abbildungen 3-24 und 3-25 zeigen, dass das lineare Substrat trotz äquimolarer Mengen TFO-scPvuII-Heterokonjugat und Plasmid nur zu ca. 80 % gespalten wurde, was daran liegen könnte, dass die eingesetzte Enzymkonzentration nicht dem tatsächlichen aktiven Enzymanteil entspricht. Somit betrug die Konzentration des aktiven TFO-Enzym-Heterokonjugats in diesem Experiment nur ca. 32 nM.

3.3.2.3 Adressierte Spaltung makromolekularer Plasmid-DNA in Konkurrenz mit λ-DNA

Als Vorexperiment für die adressierte Spaltung zellulärer DNA wurde das Plasmid pPl₂, das drei normale PvuII-Spaltstellen und eine adressierte PvuII-Spaltstelle (mit einer *triple-helix* Bindungsstelle in 9 bp-Entfernung zur PvuII-Spaltstelle) trägt, in Konkurrenz mit einem 6-

fachem Überschuss an λ -DNA vom TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat gespalten. Dadurch befand sich ein 100-facher Überschuß nicht-adressierter PvuII-Spaltstellen in Kompetiton zu einer adressierten Spaltstelle.

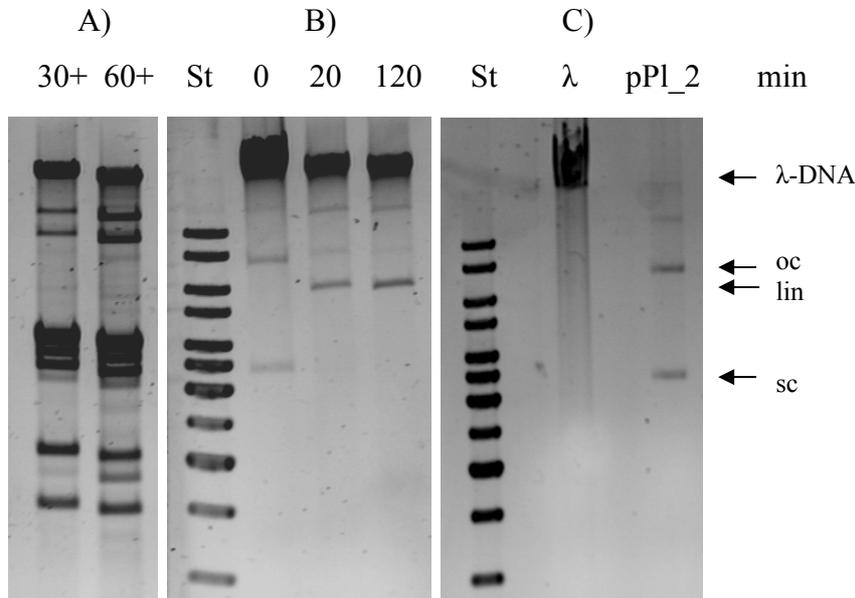


Abbildung 3-26: : Adressierte Spaltung von 0,007 pmol Plasmid-DNA, welche drei nicht-adressierte PvuII-Spaltstellen und eine adressierte PvuII-Spaltstelle mit TFS (9 bp Abstand zwischen PvuII-Spaltstelle und TFS) enthält, in Gegenwart von 0,68 pmol λ -DNA. A) Die Spaltung wurde ohne Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer mit 2,5 mM MgCl₂ gestartet. Die Spaltfragmente des Plasmids sind zu schwach gefärbt und deshalb nicht sichtbar. B) Die Spaltung wird nach 3-tägiger Vorinkubation durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthält, gestartet. Aliquots der Reaktion wurden nach 0 min, 20 min, 120 min entnommen und die Reaktion durch Zugabe von EDTA abgestoppt. C) λ -DNA und Plasmid-DNA wurden einzeln aufgetragen. Das 0,8 % Agarose-Gel wurde mit SybrGold gefärbt; Die Spaltung ohne Vorinkubation wurde nach 30 min (30+) bzw. 60 min (60+) mit EDTA abgestoppt; St = 1kb Standard (MBI); oc = *open circle*, lin = linear, sc = *supercoil*

Ohne Vorinkubation der DNA mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat werden alle PvuII-Spaltstellen, sowohl der Plasmid-DNA, als auch der λ -DNA, gespalten. Im Gegensatz dazu wurde nach 3-tägiger Vorinkubation (bei Raumtemperatur) die adressierte Spaltstelle des Plasmides hoch spezifisch gespalten.

Dieses Experiment zeigt, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat trotz hoher DNA-Dichte und dementsprechend vielen nicht adressierten PvuII-Spaltstellen so hoch spezifisch ist, dass es nur die adressierte PvuII-Spaltstelle mit *triple-helix* Bindungsstelle spaltet. Die Notwendigkeit der 3-tägigen Vorinkubationszeit beruht auf der extrem langsamen Ausbildung der *triple-helix*, was durch die Menge unspezifischer DNA noch verstärkt wird.

3.4 Kernlokalisationsexperimente

3.4.1 Analyse der Fusionsproteine *in vivo*

Die Verwendung einer hoch spezifischen Endonuklease in der Gentherapie setzt voraus, dass das Enzym in den Kern einer Zelle eingebracht werden kann. Dort kann nach der durch das Enzym katalysierten spezifischen Spaltung der DNA an der Zielsequenz die homologe Rekombination ausgelöst werden, die für den Sequenzaustausch eines Gens verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Typ II Restriktionsendonuklease als Modellsystem in diesen Kernlokalisationsexperimenten verwendet. Dafür wurde die homodimere PvuII als ECFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen transient exprimiert. Mittels Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie wurde anschließend die Lokalisation des ECFP-PvuII Fusionsproteins detektiert (Abbildung 3-27). Man konnte beobachten, dass sich das ECFP-PvuII Fusionsprotein sowohl im Zytosol als auch im Kern der Zelle befindet (Abbildung 3-27 d). Wird die *single-chain* PvuII (scPvuII) als ECFP-Fusionsprotein exprimiert, so konnte man dieses über die ganze Zelle verteilt finden (Abbildung 3-27 b). Als Kontrolle diente EGFP, das auch sowohl im Kern als auch im Zytosol verteilt war (Abbildung 3-27 e).

Nach Anfügen eines NLS (*nuclear localisation signal*) an das ECFP-scPvuII bzw. ECFP-PvuII Fusionsprotein wurden diese Proteine hocheffizient in den Kern transportiert und waren fast ausschließlich dort nachzuweisen (Abbildung 3-27 a,c). Im Falle der Kernlokalisation von ECFP-PvuII-NLS und ECFP-scPvuII-NLS waren die meisten Zellen nach Transfektion nicht lebensfähig. wtPvuII-ECFP ohne NLS ließ ebenfalls nur wenige Zellen am Leben, da dieses Fusionsprotein in den Kern diffundieren konnte (Abbildung 3-27 d). Der Tod der Zellen kann durch die Tatsache erklärt werden, dass aktive Restriktionsenzyme, die in den Zellkern transportiert werden, die zelleigene DNA spalten. Somit stirbt die Zelle infolge der vermehrten DNA-Spaltung durch das Enzym.

Als Kontrolle für Transfektionseffizienz und Lokalisation eines Proteins mit NLS in der Zelle wurde das EGFP-CAD (= Caspase aktivierte DNase) verwendet. Dieses Protein befand sich hauptsächlich im Zellkern, jedoch starben die Zellen nicht (Abbildung 3-27 f), vermutlich, weil genügend endogenes ICAD, einem spezifischen Inhibitor von CAD, in den Zellen vorhanden war.

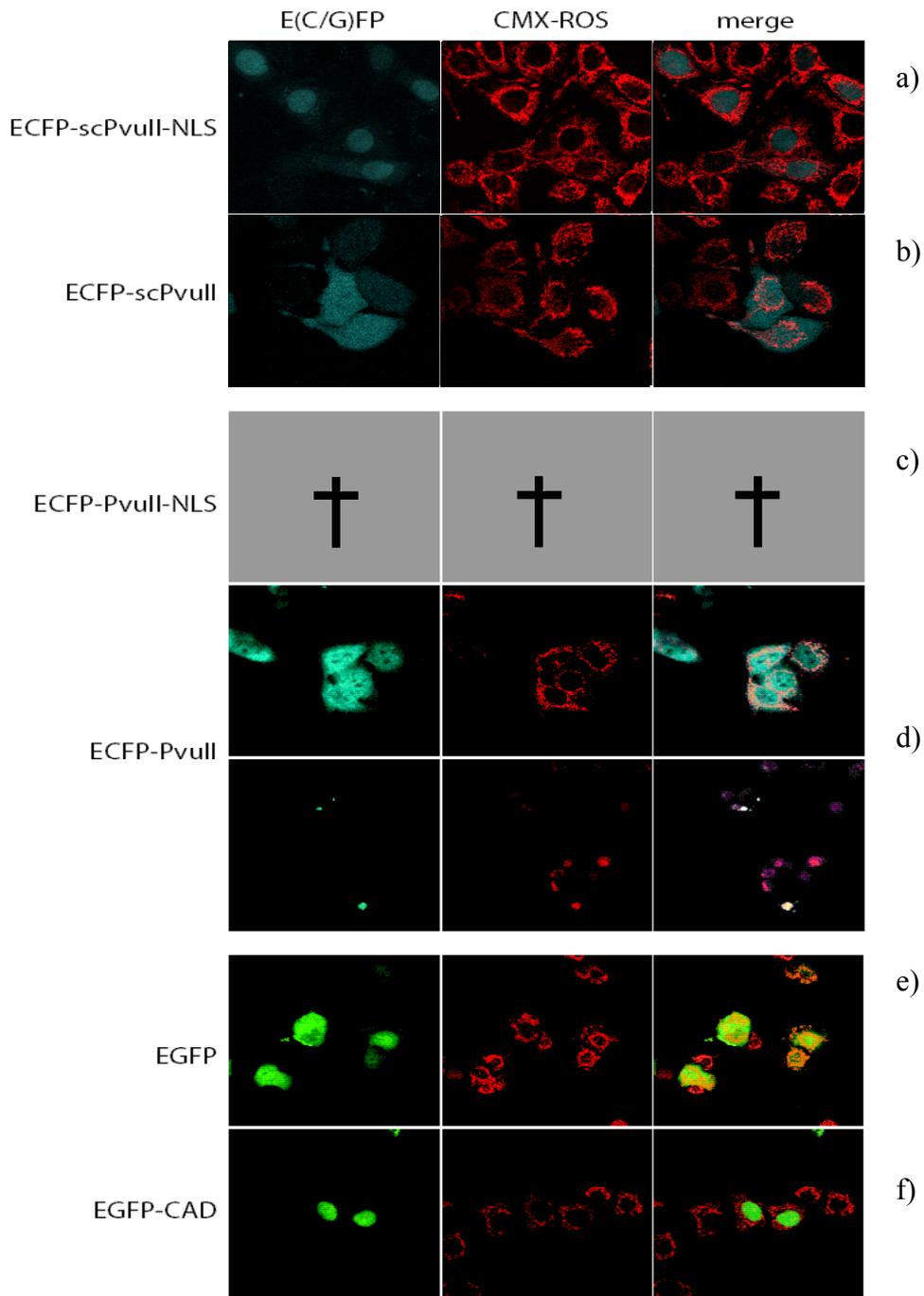


Abbildung 3-27: Kernlokalisierungsexperimente. Die Fusionsproteine ECFP-PvuII, ECFP-scPvuII, ECFP-PvuII-NLS und ECFP-scPvuII-NLS wurden transient in HeLa-Zellen exprimiert. Die Kernlokalisierung wurde mit Hilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Als Kontrolle für Transfektionseffizienz und Lokalisation dienten EGFP (ohne NLS) und EGFP-CAD (mit NLS); † alle Zellen apoptotisch oder tot; merge = Überlagerung von den beiden Bildern E(C/G)FP und CMX-ROS

3.4.2 Identifizierung der Fusionsproteine mittels Western-Blot

Zum Nachweis, dass die in eukaryontischen Zellen transfizierten Gene für die Fusionsproteine auch exprimiert werden, wurden die Proteine in 293T-Zellen überexprimiert, über eine Affinitätschromatographie-Säule aufgereinigt und mit Hilfe eines Western-Blots nach SDS-PAGE mit Anti-His-Antikörpern identifiziert. Da die Zellen, die das Fusionsprotein mit NLS exprimiert hatten, hoch-apoptotisch waren (Restriktionsenzyme spalten DNA und lösen damit Apoptose aus), konnten nur die Fusionsproteine ohne NLS in ausreichender Menge aufgereinigt werden. Abbildung 3-28 zeigt den Western-Blot der Fusionsproteine ECFP-scPvuII und ECFP-PvuII. Beide Fusionsproteine konnten spezifisch durch Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden. Beide zeigen auch ein ihrer Größe entsprechendes Laufverhalten im SDS-Gel.

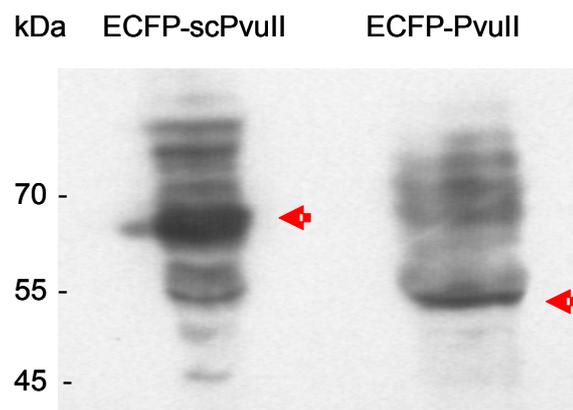


Abbildung 3-28: Western-Blot der Fusionsproteine ECFP-scPvuII und ECFP-PvuII nach Expression in 293T-Zellen, Aufreinigung über Affinitätschromatographie und anschließender Analyse mit SDS-PAGE. Die Pfeile markieren das gesuchte Protein.

3.4.3 Nachweis der Spaltspezifität der Fusionsproteine

Als zweiter Nachweis für die Expression der Fusionsproteine ECFP-scPvuII und ECFP-PvuII diene ein DNA-Spaltexperiment. Dazu wurde ein Plasmid-Substrat (5276 bp), das zwei PvuII-Spaltstellen trägt, von dem aufgereinigten ECFP-scPvuII Fusionsproteinen gespalten (siehe Abbildung 3-29).

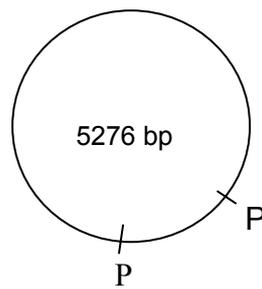


Abbildung 3-29: Schema des Substratplasmides mit zwei PvuII-Spaltstellen (P), so dass sich nach Spaltung ein 4277 bp und 999 bp langes Spaltfragment ergeben

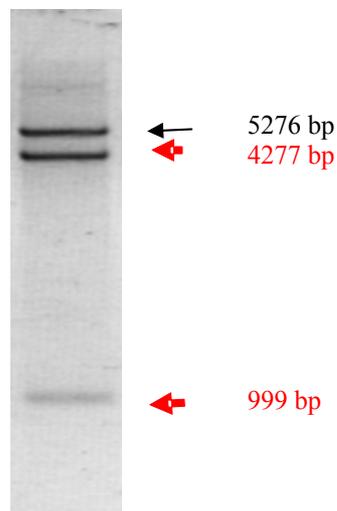


Abbildung 3-30: Nachweis der Spaltspezifität des ECFP-scPvuII Fusionsproteins. Ein Plasmid-DNA-Substrat, das zwei PvuII-Spaltstellen trägt, wurde mit dem aus ca. 2×10^7 293T-Zellen aufgereinigten Fusionsprotein für 30 min bei 37°C gespalten. Die roten Pfeile zeigen die spezifischen Spaltprodukte.

Abbildung 3-30 zeigt exemplarisch, dass das ECFP-scPvuII Fusionsprotein aktiv war, da zwei spezifische Spaltfragmente gebildet wurden. Das deutet auch darauf hin, dass das Fusionsprotein in Säugerzellen korrekt exprimiert wurde, da es aktiv war und spezifisch gespalten hat.

4 Diskussion

Für eine erfolgreiche Gentherapie wäre es wünschenswert, dass spezifische Sequenzen im Genom, z.B. in einem mutierten Gen, gezielt verändert werden können. Die beste Möglichkeit dafür besteht im Austausch dieser spezifischen Sequenzen durch homologe Rekombination. Leider erfolgt dieser Prozess nur sehr ineffizient (1 in 10^6 transfizierten Zellen) und bevorzugt an nicht-homologen Stellen im Genom. Durch Einführung eines Doppelstrangbruches an einer spezifischen Stelle der DNA kann man nicht nur die Rekombinationshäufigkeit um mehr als das 10000-fache steigern, sondern die Rekombination gezielt an dieser Stelle der DNA induzieren. Für die zukünftige Entwicklung hin zu einer erfolgreichen Gentherapie ist es deshalb von besonderem Interesse, eine Möglichkeit zu entwickeln, mit der man einzelne, definierte Doppelstrangbrüche in spezifischen Sequenzen individueller Gene erzeugen kann.

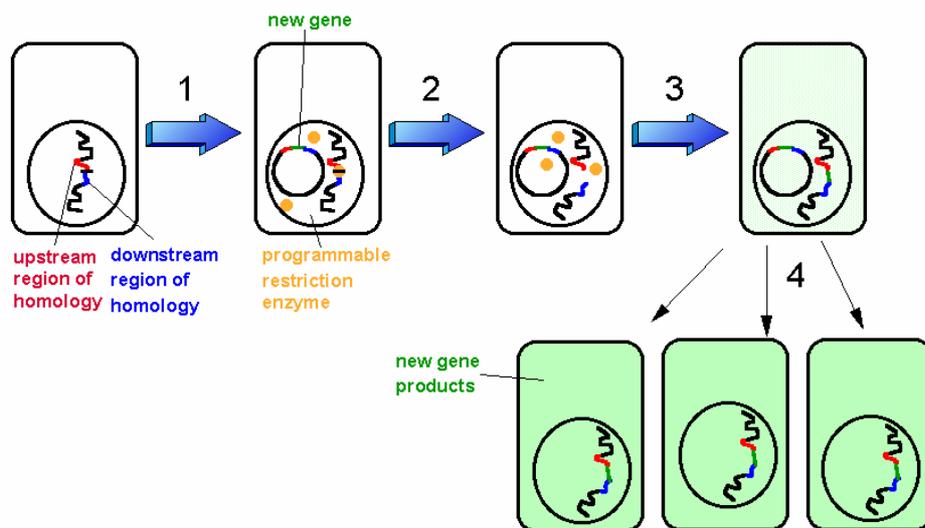
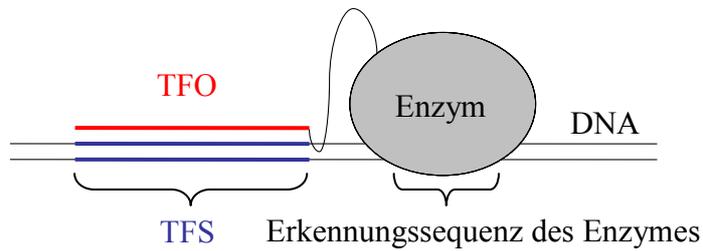


Abbildung 4-1: Prinzip der adressierten Spaltung von DNA mit Hilfe einer programmierbaren Restriktionendonuklease (TFO-Enzym Konjugat): das Konjugat und ein Plasmid werden in die Zelle eingebracht (1). Auf dem Plasmid befindet sich ein Gen, dass von Sequenzen flankiert ist, die zu den Sequenzen im Genom, in die das Gen integriert werden soll, homolog sind. Nach dem Doppelstrangbruch (2) wird das Gen ins Chromosom durch homologe Rekombination integriert (3). Damit wird das Gen an die Tochterzellen weitervererbt (4).

Restriktionsenzyme erkennen und spalten ihre Erkennungssequenz hochspezifisch, jedoch kommen diese Sequenzen aufgrund ihrer Länge von meist nur 4-6 Basenpaaren statistisch ca. 10^5 - 10^6 mal im menschlichen Genom vor. Für eine Anwendung in der Gentherapie muss die Spezifität von Restriktionsenzymen so erweitert werden, dass sie singuläre Sequenzen erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Restriktionsenzym-Oligonukleotid-Heterokonjugat entwickelt, das die Spezifität des verwendeten Restriktionsenzymen um die

Spezifität des Oligonukleotids (TFO) erweitert und somit ein Modellsystem für die flexible Kombination verschiedener Restriktionsenzyme mit verschiedenen Oligonukleotiden darstellt.



Adressierte Spaltstelle

Abbildung 4-2: Modell des Restriktionsenzym-Oligonukleotid-Heterokonjugats; Das TFO (*triple-helix-forming* Oligonukleotid) bindet spezifisch an eine TFS (*triple-helix-forming site*), während das Enzym in definiertem Abstand zur TFS seine spezifische Erkennungssequenz adressiert spaltet.

4.1 Das Restriktionsenzym scPvuIIH₆G₄C

PvuII ist eine Typ IIP Restriktionsendonuklease, welche die palindindrome Sequenz CAGCTG erkennt und zentral spaltet [Gingeras et al., 1981]. Sie interagiert als Homodimer mit doppelsträngiger DNA und spaltet beide Stränge innerhalb eines Bindungsereignisses [Tao and Blumenthal, 1992].

Zur Generierung eines Enzym-Oligonukleotid-Heterokonjugates sollte PvuII mit nur einem Oligonukleotid gekoppelt werden. Die Kopplung sollte über eine Maleimid-Reaktion mit einem bifunktionellen Crosslinker erfolgen, wofür ein Cystein in PvuII, das kein Cystein enthält, eingeführt werden musste. Da die in einem PvuII-Homodimer dazu geführt hätte, dass zwei Cysteine vorhanden wären, wurde eine *single-chain* Variante von PvuII verwendet, deren „Monomere“ über einen kurzen Peptid-Linker miteinander verbunden sind [Simoncsits et al., 2001] und die am C-terminalen Ende nach vier Glycinen und einem Hexahistidin-Tag ein einzelnes Cystein trägt. Diese Variante konnte erfolgreich in *E.coli* exprimiert und anschließend über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Spaltaktivität und Bindung konnten mit Hilfe eines Aktivitätstests und einer Anisotropie-Messung gezeigt werden, wobei die scPvuIIH₆G₄C-Variante im Vergleich zu wt-PvuII eine um den Faktor drei reduzierte katalytische Aktivität ($k_{cat}/k_M = 1,11 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$) besitzt. Dennoch ist das Enzym noch

ausreichend katalytisch aktiv, um für weiterführende Spaltexperimente verwendet werden zu können. Damit ist diese Variante prädestiniert, um ein TFO-scPvuII-Heterokonjugat zu bilden.

4.2 Analyse der Bindungseigenschaften von TFOs

TFOs (*triple-helix forming* Oligonukleotide) binden in der großen Furche der DNA unter Ausbildung einer *triple-helix*. Dabei erfolgt diese Bindung in paralleler oder antiparalleler Orientierung zum Purin-Strang des Watson-Crick-Doppelstranges. Bisher jedoch ist die Bindung unmodifizierter Oligonukleotide auf homopurin- bzw. homopyrimidinreiche Sequenzen limitiert [Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995]. Dieses Problem beruht auf der asymmetrischen Bindung des TFOs mit seinem Phosphat-Rückgrat an den Purin-Strang über Hoogsteen-Basenpaarung. In gemischten Purin/Pyrimidin-Sequenzen kann das TFO keine kontinuierlichen Hoogsteen-Bindungen ausbilden, denn dafür müsste es seine Orientierung innerhalb der Sequenz ändern, was strukturell nicht möglich ist. Ein ideales TFO ist hinsichtlich der Strang-Polarität unempfindlich. Kürzlich wurde ein TFO aus einem Set aus vier C-glycosidisch gebundenen Basen, basierend auf 2-Amino-quinazolin und 2-Amino-quinolin, die sogenannten TRIPside, entwickelt, die die Basenpaarungsmöglichkeiten G:C, C:G, A:T und T:A in der großen Furche unterscheiden können und Hoogsteen-Bindungen zu beiden Strängen des Watson-Crick-Doppelstranges ohne Änderung der Strangpolarität ausbilden können [Li et al., 2004]. Diese TFOs bilden demzufolge stabile, sequenzspezifische *triple-helices* an gemischten Purin/Pyrimidin-Sequenzen selbst unter physiologischen Bedingungen.

Im Gegensatz dazu benötigen TFOs des Pyrimidin-Motifs einen sauren pH, da für die Hoogsteen-Basenpaarung das Cytosin protoniert vorliegen muss [Singleton and Dervan, 1992; Sugimoto et al., 2001; Wu et al., 2001; Wu et al., 2002]. Unter Verwendung von 5-Methylcytosin anstelle von Cytosin kann dieses Problem überwunden werden [Lee et al., 1984; Singleton and Dervan, 1992; Xodo et al., 1994; Xodo et al., 1991; Young et al., 1991]. Verwendet man 5-Propynyluracil statt Thymin, kann die *triple-helix* weiter stabilisiert werden [Lacroix et al., 1999; Mills et al., 2002; Phipps et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch CD-Messungen, *cleavage protection assays* und *electrophoretic mobility gelshift assays* gezeigt werden (siehe Abbildungen 3-1; 3-6; 3-4), dass durch die Verwendung der oben beschriebenen modifizierten Basen eine Erhöhung der Stabilität der *triple-helix* im Pyrimidin-Motif selbst bei 37°C und physiologischem pH stabil blieb, während sie unter Verwendung unmodifizierter TFOs einen

sauren pH (6,5) und eine sehr niedrige Temperatur von 5°C benötigte. Kritisch für die Stabilität einer *triple-helix* ist aber auch die Überbrückung der elektrostatischen Abstoßung des Zuckerrückgrats des dritten Stranges. Zweiwertige positiv geladene Ionen, wie z.B. Mg^{2+} , verhindern diese Abstoßung sehr erfolgreich [Cowan, 1998; Pesco et al., 2001], allerdings ist Mg^{2+} der Kofaktor für viele Restriktionsenzyme, was für die hier durchgeführten Experimente zu berücksichtigen war.

Die *triple-helix*-Bildung erfolgt nur sehr langsam und dauert je nach Gehalt an unspezifischer DNA mehrere Stunden bis Tage. So dauerte z.B. die *triple-helix* Bildung mit einem 150mer PCR-Substrat bei 37°C drei Stunden, wie im *cleavage protection assay* deutlich wurde (siehe Abb. 3-8). In Hinsicht auf die Verwendung eines Enzym-TFO-Heterokonjugates ist die Stabilisierung der *triple-helix* durch Mg^{2+} nicht möglich, da das Mg^{2+} sofort, noch bevor die *triple-helix* ausgebildet werden könnte, die Spaltung sämtlicher anderen Schnittstellen des jeweiligen Enzyms zusätzlich zur Spaltung der adressierten Schnittstelle induzieren würde. Damit wäre die gewünschte Selektivität nicht erreicht. Die elektrostatische Abstoßung kann aber durch Verwendung von Aminoglycosiden, wie z.B. Neomycin, oder Polyaminen, wie z.B. Spermin, verhindert werden [Arimondo et al., 1999; Arya et al., 2001; Xue et al., 2002]. Das konnte auch in der vorliegenden Arbeit in einem *electrophoretic mobility gelshift* Experiment bestätigt werden (siehe Abbildung 3-5). Die verwendeten Substanzen müssen jedoch nicht nur die *triple-helix* stabilisieren, sondern gleichzeitig eine DNA-Spaltung durch das Restriktionsenzym erlauben. So zeigt PvuII, und somit auch die scPvuII-Variante, in ihrem optimalen Spaltpuffer, der 10 mM Mg^{2+} enthält, nach Zugabe von 20 mM Neomycin keine messbare katalytische Aktivität mehr, ist jedoch in Gegenwart von 1 mM Spermin aktiv. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Bedingungen zur Ausbildung einer stabilen *triple-helix* durch das scPvuII-TFO-Heterokonjugat ohne Mg^{2+} , aber mit 1 mM Spermin gewählt.

4.3 Herstellung des scPvuII-TFO-Heterokonjugates

Die Kopplung von scPvuII und TFO erfolgte unter Verwendung des bifunktionellen Crosslinkers GMBS. Dabei mussten zwei separate Crosslinkreaktionen durchgeführt werden. (1) Kopplung des Crosslinkers an das TFO und (2) Kopplung des TFO-GMBS-Konjugates mit scPvuII. Anschließend musste das Konjugat von noch freier, ungekoppelter scPvuII abgetrennt werden.

4.3.1 Kopplung von GMBS und TFO

GMBS ist ein bifunktionaler Crosslinker, der sowohl eine Maleimid-Bindung mit SH-Gruppen, als auch eine Amidbindung mit Aminogruppen ausbilden kann. Da die Kopplung mit dem Protein über die SH-Gruppe eines Cysteins erfolgen sollte, muss das GMBS über eine NH₂-Gruppe mit dem TFO reagieren. Diese Aminogruppe befand sich am 5'-Ende des TFOs, welches modifiziert von Eurogentec bezogen wurde. Aminogruppe und TFO sind durch einen Linker, bestehend aus Methylengruppen, verbunden, was die Möglichkeit bietet, durch Variation der Anzahl der Methylengruppen die Linkerlänge zwischen TFO und Protein zu verändern. GMBS gehört zu den in Wasser unlöslichen Crosslinkern, da es keine geladene Seitengruppe trägt. Deshalb wurde das GMBS in DMSO, einem organischen Lösungsmittel, gelöst.

Das DMSO ist für die erste Crosslinkreaktion völlig unbedenklich, da die DNA, und somit das TFO, keine Stabilitätsprobleme in DMSO hat. Wichtiger ist die Beachtung der Reaktionsbedingungen. So können dafür nur Phosphatpuffer, Bicarbonat/Carbonatpuffer, HEPES oder Boratpuffer verwendet werden, Tris ist gänzlich ungeeignet, da es die Reaktion inhibiert.

Die stärkste, mit der Crosslinkreaktion kompetierende Reaktion ist die der Hydrolyse, deren Rate mit steigendem pH-Wert des Reaktionsmilieus steigt. Deshalb darf der pH-Wert nicht über den neutralen Bereich hinaus in den basischen Bereich ansteigen. Auch spielt der Verdünnungsstatus der Lösung eine wichtige Rolle. Optimale Reaktionsbedingungen erhält man unter Verwendung von 0,1 – 10 mM GMBS und mindestens 10 µM Aminogruppen. Deshalb wurden in der ersten Crosslinkreaktion 4 mM GMBS mit 500 µM TFO in einem Phosphatpuffer mit pH-Wert 7,2 inkubiert. Anschließend wurde das TFO-GMBS Konjugat über zwei Gelfiltrationssäulen von dem überschüssigen GMBS und noch ungekoppeltem TFO abgetrennt, da freies GMBS mit der zweiten Crosslinkreaktion interferieren würde.

4.3.2 Kopplung des TFO-GMBS Konjugates mit scPvuII

Die zweite Kopplungsreaktion ist eine Maleimid-Reaktion des GMBS mit der SH-Gruppe eines Cysteins im Protein. Diese Reaktion erfolgt bevorzugt, wenn der pH der Lösung zwischen 6,5 und 7,5 liegt. Bei pH 7 ist die Reaktion des GMBS mit einer SH-Gruppe 1000-fach bevorzugt über die Reaktion mit einer Aminogruppe. Über pH 7,5 wird die Reaktion mit der Amino-Gruppe prominenter. Für die Kopplung des TFO-GMBS Konjugats an scPvuII wurde deshalb ebenfalls ein Phosphatpuffer pH 7,2 verwendet, so dass das Cystein mit der

Maleimid-Gruppe des GMBS reagieren kann. Die entstehende Thioether-, und auch die Amidbindung, sind selbst unter physiologischen Bedingungen stabil und können nicht gespalten werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass das gebildete TFO-scPvuII-Heterokonjugat auch stabil bleibt, so dass keine nicht-adressierte Spaltung aufgrund abgelösten Enzyms befürchtet werden muss.

4.3.3 Reinigung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates

Bei der Analyse des TFO-scPvuII-Heterokonjugates zeigte sich, dass die Crosslinkausbeute mit über 75 % zwar sehr gut ist, aber noch ca. 25 % freie scPvuII im Ansatz enthalten ist. Diese freie scPvuII muss vollständig vom Heterokonjugat entfernt werden, damit nur die adressierte Spaltung stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Reinigung des Heterokonjugates eine Strategie entwickelt, die sich den TFO-Anteil zunutze macht. Das TFO hat ein negativ geladenes Phosphatrückgrat, welches an eine positiv geladene Matrix binden kann. Bleibt man mit dem pH-Wert der Lösung in der Nähe des isoelektrischen Punktes eines Proteins (oder möglichst darunter), kann man ein Konstrukt mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie von dem freien Protein abtrennen. ScPvuII hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 6,4, jedoch neigt das Enzym zum Denaturieren, sobald man diesen Punkt unterschreitet. Deshalb wurde für die Anionenaustauschchromatographie ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 verwendet. Dennoch reichte die negative Ladung des TFO-Rückrates aus, um das Konstrukt erfolgreich aufzureinigen.

Kritisch war, dass der Kopplungsansatz nur sehr stark verdünnt auf die Säule aufgetragen werden durfte. Bei Überschreiten der Konzentrationsgrenze der Lösung von ca. 1 μM , kann scPvuII mit weiteren Molekülen entweder durch Interaktion der Untereinheiten Multimere bilden oder unspezifisch aggregieren. Dadurch wird eine quantitative Abtrennung der freien scPvuII verhindert. Verdünnt man den Ansatz vor dem Auftragen auf die Säule aber unter diese 1 μM -Grenze und inkubiert das Gemisch für mehrere Minuten bei Raumtemperatur, so dissoziieren die Aggregate und das Heterokonjugat kann vollständig aufgereinigt werden.

4.4 Adressierte Spaltung

4.4.1 Adressierte Spaltung von PCR-Substraten

Das aufgereinigte TFO-scPvuII-Heterokonjugat wurde hinsichtlich seiner Spalteigenschaften überprüft. Dafür wurden zwei unterschiedliche PCR-Substrate generiert: ein langes, nicht-adressierbares 478mer ohne *triple-helix*-Bindungsstelle neben der PvuII-Spaltstelle und ein kurzes, adressierbares 239mer mit *triple-helix*-Bindungsstelle neben der PvuII-Spaltstelle. Das kürzere Substrat hat bis auf die TFS im überlappenden Bereich die gleiche Sequenz wie das lange Substrat.

Die verwendeten Substrate wurden zunächst ohne Vorinkubation mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat in jeweils einzelnen Reaktionen oder in Konkurrenz gespalten. Die Ergebnisse der Spaltkinetiken zeigten im Vergleich, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat hochaktiv ist und keines der Substrate in seiner Spaltreaktion bevorzugt. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, das TFO-scPvuII-Heterokonjugat zur adressierten Spaltung einzusetzen. Dazu wurde das Heterokonjugat mit adressiertem 239mer und nicht-adressiertem 478mer in äquimolaren Mengen vorinkubiert, wofür die zuvor getesteten Bedingungen verwendet wurden, die zur Ausbildung einer *triple-helix* optimal sind (pH 7,2, 1 mM Spermin, RT). Damit sollte gewährleistet werden, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat nur an solche DNA-Stellen gebunden wird, an denen das TFO eine stabile *triple-helix* ausbilden kann. Da der für die DNA-Bindung und -Spaltung durch PvuII benötigte Kofaktor Mg^{2+} fehlte, sollte unter den Inkubationsbedingungen keine Bindung des Enzyms an die unadressierten Spaltstellen der DNA und damit später keine unadressierte Spaltung der DNA erfolgen. Zum Start der Spaltreaktion wurde dieser Ansatz auf 37 °C erwärmt und PvuII-Spaltpuffer mit einer definierten Mg^{2+} -Konzentration zugesetzt. Die Auswertung der Spaltkinetiken mittels exponentieller Kurvenanpassung ermöglichte eine k -Wertbestimmung für die Spaltgeschwindigkeit des jeweiligen Substrates. Durch Bildung des Quotienten $k_{\text{adressiert}}/k_{\text{nicht-adressiert}}$ konnte die Spezifität der adressierten Spaltung bestimmt und quantitativ erfasst werden (Tabelle 3.1.1-1 und 3.3.1-2).

In diesen Spaltexperimenten wurden zwar beide Substrate trotz Vorinkubation mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat gespalten, die Spaltgeschwindigkeit des adressierten Substrates ist im Gegensatz zur Spaltgeschwindigkeit des nicht-adressierten Substrates jedoch höher. Dabei zeigte sich, dass die Spaltgeschwindigkeit des adressierten Substrates unverändert hoch bleibt, die Spaltgeschwindigkeit des nicht-adressierten Substrates jedoch mit abnehmender Mg^{2+} -

Konzentration langsamer wird, bis sie schließlich nahezu zum Stillstand kommt. Dies erklärt sich dadurch, dass PvuII vier Mg^{2+} -Ionen benötigt, um einen aktiven PvuII-DNA- Mg^{2+} -Komplex zu bilden [Jose et al., 1999; Spyridaki et al., 2003]. In den adressierten Spaltexperimenten bei geringen Mg^{2+} -Konzentrationen wird die Bindung des Enzyms an die DNA vorwiegend durch die *triple-helix* bestimmt. Somit werden die adressierten Sequenzen bevorzugt gespalten. Für die Bindung des Kofaktors muss sich das Enzym in unmittelbarer Nähe zur DNA befinden. Man nimmt an, dass in den adressierten Spaltexperimenten der Enzymanteil des TFO-scPvuII-Heterokonjugates, nicht aber das TFO, kurz von der DNA abdiffundiert, um die Mg^{2+} -Ionen aufzunehmen. Dabei ist wahrscheinlich, dass die Ionen direkt im oder am katalytischen Zentrum des Enzyms und nicht erst von der DNA gebunden werden, um dann ins Enzym umgelagert zu werden. Da sich das Enzym durch die Verknüpfung mit der TFS in unmittelbarer Nähe zu seiner spezifischen Erkennungssequenz befindet, kann es nach Anlagerung des Kofaktors sofort diese Sequenz binden und spalten. Es ist weiterhin zu beobachten, dass sich trotz unzureichender Menge an Mg^{2+} -Ionen keine *nicked (open circular)* Intermediate ansammeln, da das Enzym durch die Verbindung mit der *triple-helix* in direkter Nähe zu dieser Stelle verbleibt und unmittelbar nach der Spaltung des ersten DNA-Stranges den zweiten spalten kann. Daraus resultiert, dass die Spaltgeschwindigkeiten von scPvuII durch die *triple-helix* trotz suboptimaler Konzentration $MgCl_2$ gegenüber den *single-turnover* Bedingungen dreifach und gegenüber den *multiple-turnover* Spaltbedingungen von wt-PvuII siebenfach erhöht sind.

Hinzu kommt, dass das TFO-scPvuII-Heterokonjugat an der adressierten Spaltstelle über das TFO immobilisiert bleibt, so dass es nach erfolgter adressierter Spaltung keine weiteren, nicht-adressierten Spaltstellen angreifen kann. Die fehlende Produktdissoziation im Falle des adressierten Substrates erklärt auch, warum dieses nicht vollständig gespalten wird, obwohl es mit äquimolaren Mengen TFO-scPvuII-Heterokonjugat inkubiert wurde, da anzunehmen ist, dass die TFO-scPvuII-Heterokonjugat-Präparation auch katalytisch inaktives Enzym enthält, das an eine adressierte Spaltstelle gebunden wird. In Experimenten, in denen die Substrate in zweifachem Überschuss zum TFO-scPvuII-Heterokonjugat in einem adressierten Spaltexperiment eingesetzt wurden, nahm die Spalteffizienz entsprechend der relativen Menge eingesetzten TFO-scPvuII-Heterokonjugates ab.

Die optimalen Reaktionsbedingungen für die adressierte Spaltung hingen aber nicht nur von einer geringen Mg^{2+} -Konzentration, sondern auch von der Ionenstärke ab (siehe 4.4.2). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb PvuII-Spaltpuffer mit 1,25 mM $MgCl_2$ (in Abwesenheit von NaCl) oder 2,5 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von 100 mM NaCl verwendet.

Da in diesen Experimenten die Spaltgeschwindigkeit des nicht-adressierten Substrates nur abgeschätzt werden konnte, waren die optimalen Spaltbedingungen nur durch die Bestimmung der Spaltgeschwindigkeit des adressierten Substrates zu ermitteln.

Eine weitere Serie von Experimenten zur adressierten Spaltung diente der Optimierung des Abstandes der TFS zur PvuII-Schnittstelle (bei gegebener Linkerlänge). Hierzu wurden fünf zusätzliche adressierte Substrate in den Konkurrenzspaltungen jeweils mit einem nicht-adressierten Substrat eingesetzt. Auf diesen Substraten variierte der Abstand von PvuII-Spaltstelle und *triple-helix*-Bindungsstelle um 2 bp, betrug also 3 bp, 5 bp, 7 bp, 11 bp und 13 bp. Außerdem wurde die Linkerlänge zwischen TFO und scPvuII variiert. Somit wurden in diesen Experimenten jeweils zwei TFO-scPvuII-Heterokonjugate, TFO_{C6}-scPvuII mit C6-Linker (6 Methylengruppen) und das TFO_{C12}-scPvuII mit C12-Linker (12 Methylengruppen), eingesetzt. Diese Kombination aus unterschiedlichen Linkerlängen sowie unterschiedlichem Abstand von TFS und PvuII-Spaltstelle ermöglichte es, die optimale Konstellation zu finden, in der das adressierte Substrat gegenüber dem nicht-adressierten Substrat hochpräferentiell gespalten wird. Dabei kann man festhalten, dass die adressierten Substrate mit 9 bp und 11 bp Abstand von TFS und PvuII-Spaltstelle bei gegebener Linkerlänge von 6 oder 12 Methylengruppen jeweils am besten gespalten werden, vermutlich weil dieser Abstand genau einer Helixwindung entspricht. Somit treten keine sterischen Hinderungen auf, wenn das immobilisierte Protein der Helixperiodizität folgt, um seine gegenüber der TFS versetzten Spaltsequenzen zu spalten. Das TFO-scPvuII-Heterokonjugat mit C12-Linker spaltet diese beiden Substrate jedoch schneller als das Konjugat mit C6-Linker. Die Spaltgeschwindigkeitskonstanten sind mit $k_{9\text{ bp_C12}} = 3,2\text{ min}^{-1}$ und $k_{11\text{ bp_C12}} = 3,1\text{ min}^{-1}$ 6- bzw. 3-fach größer, als die Spaltgeschwindigkeitskonstanten des TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugates ($k_{9\text{ bp}} = 0,5\text{ min}^{-1}$ und $k_{11\text{ bp}} = 1\text{ min}^{-1}$). Die Spaltgeschwindigkeitskonstanten gegenüber Substraten, deren Abstand zwischen TFS und PvuII-Spaltstelle kürzer als 7 bp ist, nehmen bei Spaltung mit dem TFO_{C6}-scPvuII-Heterokonjugat stark ab. Im Gegensatz dazu werden auch diese Substrate vom TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat besser gespalten, sogar mit Spaltgeschwindigkeitskonstanten, die nicht kleiner sind als die größte Spaltgeschwindigkeitskonstante unter Verwendung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates mit C6-Linker ($k_{11\text{ bp_C6}} = 1\text{ min}^{-1}$). Aus diesen Daten konnte die Spaltpräferenz durch Bildung des Quotienten aus $k_{\text{adressiert}}/k_{\text{nicht-adressiert}}$ dargestellt werden (siehe Tabellen 3.3.1-1 und 3.3.1-2).

Ein längerer flexibler Linker ermöglicht offenbar auch, dass das Protein der Helixwindung folgen kann, wodurch Substrate mit kürzeren Abständen von 3 bp bis 7 bp zwischen TFS und PvuII-Spaltstelle noch gespalten werden können.

4.4.2 Adressierte Spaltung in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Im zellulären Milieu liegen Ionenstärken entsprechend 0,1-0,2 mM NaCl vor. Deshalb wurde in einer weiteren Serie von Experimenten der Einfluss der Ionenstärke auf die Spaltgeschwindigkeit und Spalteffizienz des TFO-scPvuII-Heterokonjugates untersucht. In diesen Experimenten wurde nur das TFO_{C12}-scPvuII-Heterokonjugat mit dem adressierten Substrat mit 9 bp Abstand von TFS und PvuII-Spaltstelle in Konkurrenz mit dem nicht-adressierten Substrat vorinkubiert, da bereits herausgefunden wurde, dass diese Konstellation die beste Spaltpräferenz zeigt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PvuII-Spaltpuffer, der 1,25 mM bzw. 2,5 mM MgCl₂, sowie jeweils unterschiedliche Konzentrationen NaCl (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM) enthielt, gestartet.

Für wt-PvuII ist bekannt, dass es selbst bei relativ hohen Ionenstärken (100 mM NaCl) DNA spaltet. Bisher ist nicht bekannt, ob PvuII ähnlich wie EcoRV seine Spalteigenschaften durch Zugabe von NaCl ändert. Bei EcoRV resultiert einer Erhöhung der Ionenstärke darin, dass seine Bindung an unspezifische Sequenzen so stark herabgesetzt wird, dass das Protein nach erfolgter Spaltung von der DNA abdissoziiert und seinen Mechanismus von prozessiv zu distributiv ändert [Jeltsch and Pingoud, 1998]. Da das TFO-scPvuII Heterokonjugat aber durch die *triple-helix* an seiner adressierten Spaltstelle immobilisiert ist, kann es diese Sequenz nicht durch lineare Diffusion entlang des DNA-Stranges verlassen, sondern nur direkt abdissoziieren, soweit es die Flexibilität des Linkers erlaubt. Durch das NaCl wird die erneute Bindung des Proteins stark herabgesetzt, so dass das Auffinden einer nicht-adressierten Spaltsequenz erschwert wird.

Betrachtet man die Spaltaktivität auf dem adressierten Substrat, so zeigt das TFO-scPvuII-Heterokonjugat bis 20 mM NaCl keine Änderung der Spaltaktivität ($k_{\text{adressiert}} = 3 \text{ min}^{-1}$), wobei es keinen Unterschied macht, ob die Spaltung mit 1,25 mM oder 2,5 mM MgCl₂ gestartet wurde. Ab einer Konzentration von 30 mM MgCl₂ reduziert sich diese Spaltaktivität, bis sie bei 100 mM NaCl und 1,25 mM MgCl₂ sechsfach, bei 100 mM NaCl und 2,5 mM MgCl₂ dreifach reduziert ist. Es ist demnach anzunehmen, dass das NaCl auch mit der Bindung der adressierten Spaltsequenz bei ungesättigter Mg²⁺-Ionenbindung interferiert, da sich bei einer MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM die Spaltgeschwindigkeit halbiert. Die Spaltgeschwindigkeitskonstante unter nahezu physiologischen Bedingungen (100 mM NaCl und 1,25 mM MgCl₂) betrug $k = 0,5 \text{ min}^{-1}$ und war somit noch ausreichend detektierbar, wodurch anzunehmen ist, dass eine effektive adressierte Spaltung auch *in vivo* möglich sein sollte.

4.4.3 Adressierte Spaltung von makromolekularem Substrat

Die adressierte Spaltung von makromolekularer DNA sollte zeigen, dass eine Übertragung der mit Oligonukleotiden und PCR-Produkten gewonnenen Ergebnisse auch auf natürliche, makromolekulare Substrate möglich ist. Zunächst wurde dazu ein Plasmid, das vier nicht-adressierte sowie eine adressierte Spaltstelle, die sich in 9 bp Abstand von einer *triple-helix* Bindungsstelle befindet, verwendet. Wird das *supercoil* Plasmid nach Vorinkubation unter optimalen Bedingungen (2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl) gespalten, zeigt sich, dass das *open circle* Intermediat akkumuliert, bevor das linearisierte Produkt entsteht. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass bei nicht optimaler Mg²⁺-Ionenkonzentration, das PvuII-Enzym erst einen Strang seines Substrates spaltet, bevor der zweite Strang gespalten werden kann. Da das lineare Produkt dennoch entsteht, kann davon ausgegangen werden, dass der Linker dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat genügend Flexibilität verleiht, um sich auf der DNA zu rearrangieren und den zweiten Strang zu spalten. Auch diese Spaltung ist hochspezifisch (1000-fache Präferenz), da die anderen vier, nicht-adressierten Spaltstellen nicht gespalten werden.

Vergleicht man die Spaltung von vorlinearisierter mit *supercoil* Plasmid-DNA, so wird die adressierte Spaltstelle des linearen Substrates 3-fach schneller gespalten ($k_{\text{linear}} = 3,9 \text{ min}^{-1}$), als die des *supercoil* Substrates ($k_{\text{supercoil}} = 1,4 \text{ min}^{-1}$), die mit der des PCR-Substrates unter den selben Bedingungen (100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂) vergleichbar ($k_{\text{PCR}} = 1,1 \text{ min}^{-1}$) ist. Bei der Spaltung des vorlinearisierten Substrates entstehen zwei Spaltfragmente, die für die Spaltung der adressierten PvuII-Spaltstelle charakteristisch sind. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die adressierte PvuII-Spaltstelle auch auf makromolekularem Substrat hoch spezifisch gespalten wird, wobei die Spaltpräferenz gegenüber den nicht-adressierten Spaltstellen mehr als das 1000-fache beträgt.

4.4.4 Adressierte Spaltung in Konkurrenz mit λ -DNA

Humane genomische DNA ist typischerweise an Histone gebunden und dicht in Chromatin gepackt. Packungsstatus und Modifikationen, wie z.B. Methylierung und Acetylierung geben den Expressionsstatus eines Genabschnittes wieder. Für die Anwendung der TFOs in der Antigen-Strategie (siehe 1.1.1) oder der adressierten DNA-Spaltung ist es deshalb wichtig herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß die Eigenschaften genomischer DNA mit der *triple-helix* Bindung interferieren. Auch zelluläre Faktoren können das Bindungsverhalten

von TFOs an eine genomische Zielsequenz beeinflussen. Um solche Einflüsse auf das Bindungsverhalten der TFOs zu untersuchen, wurden bereits Methoden, wie z.B. kompetitive PCR, *restriction enzyme protection assay*, oder *primer extension assay* [Majumdar et al., 2003] verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass der Zellzyklus einen großen Einfluss auf die Bioaktivität der TFOs hat, jedoch TFOs prinzipiell genomische DNA binden können. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass auch das TFO-scPvuII-Heterokonjugat in der Lage ist, genomische DNA über die *triple-helix* Bildung zu binden und zu spalten. Allerdings besteht in humaner genomischer DNA ein hoher Überschuss nicht-adressierter PvuII-Schnittstellen, da diese statistisch alle 4096 bp (4^6 bp) vorkommen. Als richtungsweisendes Experiment für die adressierte Spaltung genomischer DNA mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat wurde deshalb ein Plasmid mit einer adressierten PvuII Spaltstelle in Konkurrenz mit einem 100-fachen Überschuss an nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen gespalten. Das Plasmid enthält 3 und λ -DNA 15 nicht-adressierte PvuII-Schnittstellen. Durch den großen Überschuss an λ -DNA simuliert man einerseits die hohe Dichte genomischer DNA im Zellkern und andererseits das Vorkommen vieler PvuII Spaltstellen, die in Konkurrenz zu einer adressierten Spaltstelle treten. Eine direkte Spaltung dieses Ansatzes mit dem TFO-scPvuII-Heterokonjugat ohne Vorinkubation des Heterokonjugats mit der DNA und damit ohne wesentliche *triple-helix* Bildung zeigt, dass sämtliche PvuII Schnittstellen durch das Heterokonjugat gespalten werden können. Erlaubt man in einer Vorinkubation die Ausbildung der *triple-helix* und startet die Reaktion durch Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} , spaltet das Heterokonjugat jedoch ausschließlich die adressierte Spaltstelle auf dem Plasmid, nicht aber die nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen. Kritisch dafür ist eine ausreichend lange Inkubationszeit, die durch die hohe DNA-Konzentration im Ansatz wesentlich länger sein muss, als in den Spaltansätzen ohne λ -DNA. Dies erklärt sich damit, dass die *triple-helix* Bildung nur sehr langsam erfolgt. Je höher die DNA-Konzentration im Ansatz ist, desto mehr Zeit benötigt das TFO, um seine spezifische Sequenz zu finden. Ist die Bindung erfolgt, so ist sie jedoch sehr stabil. Das TFO-scPvuII-Heterokonjugat bleibt demzufolge nach Bindung an seine spezifische *triple-helix* Bindungsstelle auf der Plasmid-DNA immobilisiert und ist nicht mehr in der Lage, andere PvuII Spaltstellen zu spalten.

Durch die Notwendigkeit einer langen Inkubationszeit benötigt man ein Enzym, das über diesen langen Zeitraum stabil und aktiv bleibt. Inaktivierte Konjugate würden zwar noch die DNA an der Zielsequenz über das TFO binden, könnten aber nicht mehr spalten. Da man den Grad der Proteinstabilisierung nicht abschätzen kann, besteht hierin ein mögliches Problem in der effizienten und zuverlässigen Anwendung solcher Heterokonjugate und in der

Berechenbarkeit ihrer Effekte. Deshalb müssen TFOs entwickelt werden, die wesentlich schnellere Bindungseigenschaften besitzen. Mit solchen TFOs würde ein Protein-TFO-Heterokonjugat seine Zielsequenz schneller erreichen, so dass das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit noch seine volle Aktivität besitzt [James et al., 2003; Paes and Fox, 1997].

4.5 Anwendung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates *in vivo*

Die Anwendung des TFO-scPvuII-Heterokonjugates in Zellen setzt voraus, dass Zellen mit dem Konjugat „profektiert“ (Protein-Transfektion) werden können, dass das Konjugat mit Hilfe eines NLS zielgerichtet in den Kern transportiert wird (siehe 4.5.1) und dass dort die Aktivität des Enzyms gesteuert werden kann.

Für eine adressierte Spaltung ist es eine besondere Herausforderung, das TFO-scPvuII Heterokonjugat als fertige TFO-Protein-Chimäre in die Zelle zu schleusen, da das Konjugat *in vitro* hergestellt werden muss. Mit SAINT von *Synvolux therapeutics laboratories* (unpublizierte Daten) konnte gezeigt werden, dass eine Profektion (Protein-Transfektion) von PvuII generell möglich ist [P. McLaughlin, unveröffentlicht; G. Meiss, persönliche Mitteilung]. Weiterführend müsste dies für das TFO-scPvuII-Heterokonjugat und Varianten eines solchen gezeigt werden, die durch Fusion mit einem NLS gezielt in den Zellkern transportiert werden können.

Am Beispiel eines ECFP-scPvuII-Fusionsproteins konnte in dieser Arbeit die Kerntransportierbarkeit dieses Fusionsproteins mit Hilfe des SV 40-NLS nach Transfektion von Hela-Zellen gezeigt werden (siehe 4.5.1). Dabei konnte beobachtet werden, dass transient exprimiertes PvuII eine hohe Apoptoserate hervorrufen kann. Die Mg^{2+} -Konzentration des zellulären Milieus ist nämlich ausreichend, um die Spaltaktivität von PvuII und damit des TFO-scPvuII-Heterokonjugats zu induzieren, sobald das Protein oder Konjugat die DNA des Zellkerns erreicht hat. Die Ausbildung einer spezifischen *triple-helix* wird sehr wahrscheinlich nie schnell genug sein (siehe 4.4.5), so dass das Konjugat DNA *in vivo* erst nach erfolgreicher *triple-helix* Bildung adressiert spaltet. Deshalb muss die katalytische Aktivität des Enzymes kontrolliert werden. *In vitro* wurde das durch Präinkubation des Heterokonjugates mit dem Substrat in Abwesenheit von Mg^{2+} möglich. Erst nach vollständiger Bindung des Konjugates an die *triple-helix* Bindungsstelle wurde das Enzym durch Mg^{2+} -Zugabe aktiviert. Eine Möglichkeit für *in vivo*-Applikationen besteht in der Verwendung eines „caged enzyme“ zur Herstellung des TFO-Enzym Heterokonjugats. Das

aktive Zentrum eines solchen Enzyms wird durch ein Molekül oder eine reaktive Gruppe blockiert. Durch einen Stimulus von außen, z.B. durch Licht, wird diese Gruppe aus dem aktiven Zentrum entfernt, wodurch das Enzym seine Aktivität zurückgewinnt. Ein geeignetes chemisches Agens könnte beispielsweise 5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromid (DMNBB) sein, das spezifisch mit Cysteinen reagiert und durch Beleuchten mit Licht einer Wellenlänge von 300-340 nm entfernt werden kann [Marriott and Ottl, 1998].

4.5.1 Kernlokalisationsexperimente

Ein Molekülaustausch zwischen Kern und Zytoplasma bedingt das Vorhandensein nuklearer Porenkomplexe (NPC), die in die Kernmembran eingebettet sind [Feldherr and Akin, 1997; Feldherr and Dworetzky, 1988]. NPCs haben in höheren Eukaryoten eine Masse von ca. 125 MDa. Sie erlauben zwei Möglichkeiten des nukleozytoplasmatischen Austauschs: passive Diffusion und gerichteten Transport. Die passive Diffusion ist ein schneller Prozess und erfolgt völlig ohne spezifische Interaktionen zwischen den diffundierenden Molekülen und den Bestandteilen des NPCs. Das Größenlimit für diese Moleküle beträgt 20–40 kDa. Im Gegensatz dazu können größere Moleküle nur über den gerichteten Transport in den Kern gelangen, eine Tatsache, die für die Erklärung der im Folgenden geschilderten Experimente von Bedeutung ist.

Der am besten charakterisierte Mechanismus eines solchen Translokationsprozesses ist der Protein-Import aufgrund eines Kernlokalisierungssignals (NLS) [Benditt et al., 1989; Dingwall and Laskey, 1991; Nehrbass and Hurt, 1992]. Ein NLS besteht aus einem Cluster basischer Aminosäurereste (monopartite) oder aus zwei Klustern basischer Aminosäurereste (bipartite), die von 10 bis 12 Aminosäuren getrennt werden [Kalderon et al., 1984; Robbins et al., 1991]. Der Prototyp eines monopartiten NLS ist das NLS des SV 40 T-Antigens. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die TypII Restriktionsendonuklease PvuII mit Hilfe des SV 40-NLS in den Zellkern transloziert werden kann. Die Klärung dieser Frage ist insbesondere deswegen wichtig, weil in der Gentherapie nur solche Enzyme eingesetzt werden können, die zielgerichtet ins Genom transportiert werden.

In dieser Arbeit wurde die *single chain* Variante von PvuII (scPvuII) zur Herstellung des programmierbaren Restriktionsenzym verwendet. Eine monomere Untereinheit von PvuII ist 18 kDa groß und dimerisiert zu einem 36 kDa funktionellen Enzym. Um das Expressions- und Verteilungsmuster des Enzyms sichtbar zu machen, wurde es in der vorliegenden Arbeit als Fusionsprotein mit ECFP (*Enhanced Cyano Fluorescent Protein*), einer Variante des GFP

(*Green Fluorescent Protein*) in eukaryontischen Säugerzellen exprimiert und mittels Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie beobachtet. GFP ist ein fluoreszierendes Protein, dessen Chromophor als Abschnitt der posttranslational modifizierten Polypeptidkette ein direkter Teil des Proteins ist. Dadurch fluoresziert das Protein unter UV-Licht ohne Zusatz eines Substrates intensiv grün. ECFP-PvuII hat ein Molekulargewicht von 48 kDa und befindet sich gerade am Größenlimit, um in den Zellkern diffundieren zu können. Im Zellkern genügen somit theoretisch schon zwei Monomere, um ein hoch aktives dimeres Restriktionsenzym bilden zu können, das die DNA der Wirtszelle spaltet. Tatsächlich sind die meisten Zellen, die dieses ECFP-PvuII exprimierten, apoptotisch, das Fusionsprotein somit letal. Deshalb kann man davon ausgehen, dass eine Diffusion des Fusionsproteins in den Zellkern stattfindet. Aus den wenigen lebenden Zellen konnte dennoch die Expression dieses Proteins mittels Western-Blot erfolgreich nachgewiesen werden. In diesen Zellen sah man, dass das Protein im Zytoplasma und im Zellkern gleichermaßen verteilt war.

In einem parallel durchgeführten Versuch wurde ECFP-PvuII mit SV 40-NLS transient exprimiert. Leider konnten 24 h nach Transfektion keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden, da durch dieses NLS und die wahrscheinlich damit verbundene starke Akkumulation des Fusionsproteins im Kern, dessen letale Wirkung verstärkt wurde. Die gleichen Experimente wurden mit scPvuII durchgeführt. Auch hier konnte man beobachten, dass das ECFP-scPvuII Fusionsprotein gleichmäßig in der Zelle verteilt war, obwohl das Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa deutlich über dem Größenlimit für die Diffusion in den Zellkern liegt. Dieses Fusionsprotein scheint jedoch weniger aktiv zu sein als das wt-ECFP-PvuII Enzym, denn es waren deutlich weniger Zellen apoptotisch und wesentlich mehr Protein mittels Western-Blot nachweisbar. *In vitro* Spaltexperimente zeigten aber, dass das Fusionsprotein aktiv ist. In diesen Experimenten wurde ein Plasmid, das zwei PvuII-Spaltstellen trägt, von gereinigtem ECFP-scPvuII gespalten, so dass die charakteristischen Spaltprodukte entstanden. Koppelt man ECFP-scPvuII mit dem SV 40-NLS, so ist das ECFP-scPvuII-NLS Fusionsprotein 24 h nach Transfektion vollständig im Zellkern zu finden. Das Überleben eines Großteils transfizierter Zellen, weist erneut auf die reduzierte Aktivität des ECFP-scPvuII Fusionsproteins hin.

Diese Experimente zeigen klar, dass ECFP-scPvuII und ECFP-PvuII durch Fusion mit dem SV 40-NLS effizient in den Kern transloziert werden können. Dabei stört es nicht, dass durch die Fusion mit ECFP die *single chain*-Protein-Variante in ihrer Aktivität reduziert ist, denn erst dadurch konnte die Lokalisation des Proteins sichtbar gemacht werden.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das adressierte TFO-scPvuII-Heterokonjugat *in vitro* hochaktiv ist und die gewünschte Spezifität aufweist, kann man nun Protein-Transfektionsexperimente mit diesem Konjugat durchführen, wofür die Transportierbarkeit des ECFP-scPvuII-Fusionsproteins in den Kern als „*proof of principle*“ für die Kerngängigkeit angesehen werden kann.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Spezifität der Restriktionsendonuklease scPvuII durch Kopplung mit der Spezifität eines TFOs (*triple-helix forming* Oligonukletids) erweitert werden. Hierfür wurde zuerst die scPvuIIH₆G₄C-Variante exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Die DNA-Bindungseigenschaften dieser Variante wurden anschließend mit und ohne den Kofaktor Mg²⁺ mit Hilfe von Fluoreszenz-Anisotropie-Messung bestimmt. Anschließend wurde ein TFO mit dem C-terminalen Ende der scPvuIIH₆G₄C-Variante unter Verwendung des bifunktionalen Crosslinkers GMBS kovalent verknüpft. Dessen mit N-Hydroxysuccimid aktivierte Carboxylatgruppe reagiert mit der NH₂-Gruppe des TFOs unter Ausbildung einer Amidbindung. Nach Entfernung des überschüssigen Crosslinkers durch Gelfiltration konnte das TFO-GMBS Konstrukt in einer zweiten Reaktion mit dem C-terminalen Cystein des Proteins über eine Thioetherbindung kovalent verbunden werden. Von dem so hergestellten TFO-scPvuII-Heterokonjugat musste anschließend ungekoppeltes, freies scPvuII abgetrennt werden, da dieses mit der adressierten Spaltung des TFO-scPvuII Konstruktes durch nicht-adressierte Spaltung interferieren würde. Diese Abtrennung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie. Die nahezu 100 %ige Reinheit des gereinigten TFO-scPvuII-Heterokonjugates konnte über SDS-PAGE gezeigt werden. Parallel dazu wurden die Bindungseigenschaften verschiedener TFOs hinsichtlich ihrer *triple-helix*-Bildung mit Hilfe verschiedener Untersuchungsmethoden, z.B. „*electrophoretic mobility shift assay*“, „*cleavage protection assay*“ und „*circular dichroism*“, charakterisiert und für die Anwendung unter physiologischen Bedingungen optimiert. Nachdem die optimalen Bedingungen zur Ausbildung einer *triple-helix* gefunden worden waren und das TFO-scPvuII-Heterokonjugat gereinigt vorlag, konnten Experimente zur adressierten Spaltung von PCR-Substraten durchgeführt werden, wobei die Mg²⁺-Konzentration, die Linker-Länge des Heterokonjugates, der Abstand zwischen adressierter PvuII-Spaltstelle und *triple-helix* Bindungsstelle und die Ionenstärke variiert wurden. In diesen Experimenten wurde eine optimale Mg²⁺-Konzentration von 1,25 mM ohne NaCl bzw. 2,5 mM mit 100 mM NaCl, sowie ein Optimum der Linker-Länge von 12 Methylengruppen (C12-Linker) und ein Abstand von 9 bp zwischen TFS und der adressierten Spaltstelle gefunden. Unter diesen optimalen Bedingungen konnten Spaltpräferenzen im dreistelligen Bereich zwischen adressierten und nicht-adressierten PvuII-Spaltstellen gemessen werden. Spaltexperimente mit makromolekularen Substraten (*supercoil* und linearer Plasmid-DNA),

sowie in Konkurrenz mit einem hohen Überschuss an λ -DNA bestätigten die hohe Präferenz für adressierte Spaltstellen durch das Konjugat.

Als erste Experimente für *in vivo* Applikationen wurden Kernlokalisationsexperimente durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass transient exprimierte scPvuII-Varianten mit einem NLS in den Nukleus transportiert werden können. Diese Ergebnisse sollen später auf das TFO-scPvuII-Heterokonjugat erweitert werden, wenn das Konjugat für adressierte Spaltexperimente *in vivo* angewendet werden soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein TFO-Restriktionsendonuklease-Heterokonjugat entwickelt, das gezielt und hochspezifisch zur adressierten Spaltung von DNA *in vitro* eingesetzt werden kann. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Mg^{2+} -Konzentration, die Salzkonzentration, die Länge des Linkers, der TFO und Protein verbindet, und der Abstand zwischen *triple-helix* Bindungsstelle und PvuII-Spaltstelle einen wesentlichen Einfluss auf die Erreichbarkeit der zur *triple-helix* Bindungsstelle direkt benachbarten PvuII-Schnittstelle und damit auf die Spaltaktivität des Konjugates haben. Dieses Heterokonjugat hat aufgrund seiner hohen Spezifität und der flexiblen Kombinierbarkeit verschiedener TFOs mit verschiedenen Restriktionsenzymen enormes therapeutisches Potential und kann nun für *in vivo* Applikationen weiter charakterisiert werden.

6. Literaturverzeichnis

Alberti, P., Arimondo, P.B., Mergny, J.L., Garestier, T., Helene, C. and Sun, J.S. (2002) A directional nucleation-zipping mechanism for triple helix formation. *Nucleic Acids Res*, **30**, 5407-5415.

Aggarwal, A.K. (1995) Structure and function of restriction endonucleases. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 11-19.

Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev*, **24**, 1-7.

Arber, W. (2003) Elements for a theory of molecular evolution. *Gene*, **317**, 3-11.

Arimondo, P.B., Bailly, C., Boutorine, A., Sun, J.S., Garestier, T. and Helene, C. (1999) Targeting topoisomerase I cleavage to specific sequences of DNA by triple helix-forming oligonucleotide conjugates. A comparison between a rebeccamycin derivative and camptothecin. *C R Acad Sci III*, **322**, 785-790.

Arimondo, P.B., Bailly, C., Boutorine, A.S., Moreau, P., Prudhomme, M., Sun, J.S., Garestier, T. and Helene, C. (2001) Triple helix-forming oligonucleotides conjugated to indolocarbazole poisons direct topoisomerase I-mediated DNA cleavage to a specific site. *Bioconjug Chem*, **12**, 501-509.

Arteca, G.A. and Mezey, P.G. (1990) A method for the characterization of foldings in protein ribbon models. *J Mol Graph*, **8**, 66-80.

Arya, D.P., Coffee, R.L., Jr., Willis, B. and Abramovitch, A.I. (2001) Aminoglycoside-nucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin. *J Am Chem Soc*, **123**, 5385-5395.

Asensio, J.L., Dosanjh, H.S., Jenkins, T.C. and Lane, A.N. (1998) Thermodynamic, kinetic, and conformational properties of a parallel intermolecular DNA triplex containing 5' and 3' junctions. *Biochemistry*, **37**, 15188-15198.

Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P.A., Wilson, K.S. and Kokkinidis, M. (1994) Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV. *Nat Struct Biol*, **1**, 469-475.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J. G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987,1988, 1989). *Current Protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Bailey, C. and Weeks, D.L. (2000) Understanding oligonucleotide-mediated inhibition of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1154-1161.

Bailey, C.P., Dagle, J.M. and Weeks, D.L. (1998) Cationic oligonucleotides can mediate specific inhibition of gene expression in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4860-4867.

- Bajor, Z., Sagi, G., Tegye, Z. and Kraicsovits, F. (2003) PNA-DNA chimeras containing 5-alkynyl-pyrimidine PNA units. Synthesis, binding properties, and enzymatic stability. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **22**, 1963-1983.
- Baldwin, G.S., Sessions, R.B., Erskine, S.G. and Halford, S.E. (1999) DNA cleavage by the EcoRV restriction endonuclease: roles of divalent metal ions in specificity and catalysis. *J Mol Biol*, **288**, 87-103.
- Beese, L.S. and Steitz, T.A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *Embo J*, **10**, 25-33.
- Bello-Roufai, M., Roulon, T. and Escude, C. (2004) Ligand-mediated transcription elongation control using triplex-based padlock oligonucleotides. *Chem Biol*, **11**, 509-516.
- Benditt, J.O., Meyer, C., Fasold, H., Barnard, F.C. and Riedel, N. (1989) Interaction of a nuclear location signal with isolated nuclear envelopes and identification of signal-binding proteins by photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9327-9331.
- Berkhout, B. and van Wamel, J. (1996) Accurate scanning of the BssHIII endonuclease in search for its DNA cleavage site. *J Biol Chem*, **271**, 1837-1840.
- Berressem, R. and Engels, J.W. (1995) 6-Oxocytidine a novel protonated C-base analogue for stable triple helix formation. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3465-3472.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.G. and Chandrasegaran, S. (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, **21**, 289-297.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G. and Carroll, D. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics*, **161**, 1169-1175.
- Blommers, M.J., Natt, F., Jahnke, W. and Cuenoud, B. (1998) Dual recognition of double-stranded DNA by 2'-aminoethoxy-modified oligonucleotides: the solution structure of an intramolecular triplex obtained by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **37**, 17714-17725.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113.
- Borgatti, M., Romanelli, A., Saviano, M., Pedone, C., Lampronti, I., Breda, L., Nastruzzi, C., Bianchi, N., Mischianti, C. and Gambari, R. (2003) Resistance of decoy PNA-DNA chimeras to enzymatic degradation in cellular extracts and serum. *Oncol Res*, **13**, 279-287.
- Bowen, L.M. and Dupureur, C.M. (2003) Investigation of restriction enzyme cofactor requirements: a relationship between metal ion properties and sequence specificity. *Biochemistry*, **42**, 12643-12653.
- Carroll, D. (2004) Using nucleases to stimulate homologous recombination. *Methods Mol Biol*, **262**, 195-207.

- Cheng, X., Balendiran, K., Schildkraut, I. and Anderson, J.E. (1994) Structure of PvuII endonuclease with cognate DNA. *Embo J*, **13**, 3927-3935.
- Chin, T.M., Lin, S.B., Lee, S.Y., Chang, M.L., Cheng, A.Y., Chang, F.C., Pasternack, L., Huang, D.H. and Kan, L.S. (2000) "Paper-clip" type triple helix formation by 5'-d-(TC)3Ta(CT)3Cb(AG)3 (a and b = 0-4) as a function of loop size with and without the pseudoisocytosine base in the Hoogsteen strand. *Biochemistry*, **39**, 12457-12464.
- Conlan, L.H. and Dupureur, C.M. (2002) Dissecting the metal ion dependence of DNA binding by PvuII endonuclease. *Biochemistry*, **41**, 1335-1342.
- Conlan, L.H. and Dupureur, C.M. (2002b) Multiple metal ions drive DNA association by PvuII endonuclease. *Biochemistry*, **41**, 14848-14855.
- Cowan, J.A. (1998) Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. *Chem Rev*, **98**, 1067-1088.
- Dieci, G., Corradini, R., Sforza, S., Marchelli, R. and Ottonello, S. (2001) Inhibition of RNA polymerase III elongation by a T10 peptide nucleic acid. *J Biol Chem*, **276**, 5720-5725.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-481.
- Diviacco, S., Rapozzi, V., Xodo, L., Helene, C., Quadrifoglio, F. and Giovannangeli, C. (2001) Site-directed inhibition of DNA replication by triple helix formation. *Faseb J*, **15**, 2660-2668.
- Dupureur, C.M. and Conlan, L.H. (2000) A catalytically deficient active site variant of PvuII endonuclease binds Mg(II) ions. *Biochemistry*, **39**, 10921-10927.
- Dupureur, C.M. and Dominguez, M.A., Jr. (2001) The PD...(D/E)XK motif in restriction enzymes: a link between function and conformation. *Biochemistry*, **40**, 387-394.
- Dupureur, C.M. and Hallman, L.M. (1999) Effects of divalent metal ions on the activity and conformation of native and 3-fluorotyrosine-PvuII endonucleases. *Eur J Biochem*, **261**, 261-268.
- Ebbinghaus, S.W., Fortinberry, H. and Gamper, H.B., Jr. (1999) Inhibition of transcription elongation in the HER-2/neu coding sequence by triplex-directed covalent modification of the template strand. *Biochemistry*, **38**, 619-628.
- Ehbrecht, H.J., Pingoud, A., Urbanke, C., Maass, G. and Gualerzi, C. (1985) Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA. *J Biol Chem*, **260**, 6160-6166.
- Fakler, B., Herlitze, S., Amthor, B., Zenner, H.P. and Ruppertsberg, J.P. (1994) Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence. *J Biol Chem*, **269**, 16187-16194.

- Falkiewicz, B., Wisniowski, W., Kolodziejczyk, A.S., Wisniewski, K. and Lankiewicz, L. (1999) Synthesis and characterization of new chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers. *Nucleic Acids Symp Ser*, 29-30.
- Faria, M., Wood, C.D., Perrouault, L., Nelson, J.S., Winter, A., White, M.R., Helene, C. and Giovannangeli, C. (2000) Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3862-3867.
- Faria, M., Wood, C.D., White, M.R., Helene, C. and Giovannangeli, C. (2001) Transcription inhibition induced by modified triple helix-forming oligonucleotides: a quantitative assay for evaluation in cells. *J Mol Biol*, **306**, 15-24.
- Feldherr, C.M. and Akin, D. (1997) The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J Cell Sci*, **110** (Pt 24), 3065-3070.
- Feldherr, C.M. and Dworetzky, S.I. (1988) The pore complex in nucleocytoplasmic exchange. *Cell Biol Int Rep*, **12**, 791-808.
- Frank-Kamenetskii, M.D. and Mirkin, S.M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu Rev Biochem*, **64**, 65-95.
- Gamper, H.B., Jr., Cole-Strauss, A., Metz, R., Parekh, H., Kumar, R. and Kmiec, E.B. (2000) A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry*, **39**, 5808-5816.
- Gasparro, F.P., Havre, P.A., Olack, G.A., Gunther, E.J. and Glazer, P.M. (1994) Site-specific targeting of psoralen photoadducts with a triple helix-forming oligonucleotide: characterization of psoralen monoadduct and crosslink formation. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2845-2852.
- Gianolio, D.A. and McLaughlin, L.W. (1999) Synthesis and triplex forming properties of pyrimidine derivative containing extended functionality. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1751-1769.
- Gilbert, D.E. and Feigon, J. (1999) Multistranded DNA structures. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 305-314.
- Gimble, F.S. (2000) Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes. *FEMS Microbiol Lett*, **185**, 99-107.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-660.
- Gowers, D.M. and Halford, S.E. (2003) Protein motion from non-specific to specific DNA by three-dimensional routes aided by supercoiling. *Embo J*, **22**, 1410-1418.
- Halford, S.E. (2001) Hopping, jumping and looping by restriction enzymes. *Biochem Soc Trans*, **29**, 363-374.
- Halford, S.E. and Marko, J.F. (2004) How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res*, **32**, 3040-3052.

- Halford, S.E. and Szczelkun, M.D. (2002) How to get from A to B: strategies for analysing protein motion on DNA. *Eur Biophys J*, **31**, 257-267.
- Hanvey, J.C., Peffer, N.J., Bisi, J.E., Thomson, S.A., Cadilla, R., Josey, J.A., Ricca, D.J., Hassman, C.F., Bonham, M.A., Au, K.G. and et al. (1992) Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*, **258**, 1481-1485.
- Helene, C., Giovannangeli, C., Guieysse-Peugeot, A.L. and Praseuth, D. (1997) Sequence-specific control of gene expression by antigene and clamp oligonucleotides. *Ciba Found Symp*, **209**, 94-102; discussion 102-106.
- Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. (2001) Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem*, **276**, 1317-1325.
- Horton, J.R. and Cheng, X. (2000) PvuII endonuclease contains two calcium ions in active sites. *J Mol Biol*, **300**, 1049-1056.
- Horton, J.R., Nastri, H.G., Riggs, P.D. and Cheng, X. (1998) Asp34 of PvuII endonuclease is directly involved in DNA minor groove recognition and indirectly involved in catalysis. *J Mol Biol*, **284**, 1491-1504.
- Ivanenko, T., Heitman, J. and Kiss, A. (1998) Mutational analysis of the function of Met137 and Ile197, two amino acids implicated in sequence-specific DNA recognition by the EcoRI endonuclease. *Biol Chem*, **379**, 459-465.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Gorlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, **16**, 6535-6547.
- Jack, W.E., Terry, B.J. and Modrich, P. (1982) Involvement of outside DNA sequences in the major kinetic path by which EcoRI endonuclease locates and leaves its recognition sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 4010-4014.
- Jeltsch, A. (2003) Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: a new function for restriction/modification systems? *Gene*, **317**, 13-16.
- Jeltsch, A. and Lanio, T. (2002) Site-directed mutagenesis by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, f, 85-94.
- Jeltsch, A. and Pingoud, A. (1998) Kinetic characterization of linear diffusion of the restriction endonuclease EcoRV on DNA. *Biochemistry*, **37**, 2160-2169.
- Jeltsch, A., Alves, J., Oelgeschlager, T., Wolfes, H., Maass, G. and Pingoud, A. (1993) Mutational analysis of the function of Gln115 in the EcoRI restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis. *J Mol Biol*, **229**, 221-234.
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. and Pingoud, A. (1994) Pausing of the restriction endonuclease EcoRI during linear diffusion on DNA. *Biochemistry*, **33**, 10215-10219.

- Jeltsch, A. and Pingoud, A.M. (2001) Methods for determining activity and specificity of DNA binding and DNA cleavage by class II restriction endonucleases. *Methods Mol Biol*, **160**, 287-308.
- Jeltsch, A., Wenz, C., Wende, W., Selent, U. and Pingoud, A. (1996) Engineering novel restriction endonucleases: principles and applications. *Trends Biotechnol*, **14**, 235-238.
- Jose, T.J., Conlan, L.H. and Dupureur, C.M. (1999) Quantitative evaluation of metal ion binding to PvuII restriction endonuclease. *J Biol Inorg Chem*, **4**, 814-823.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499-509.
- Kim, Y.G. and Chandrasegaran, S. (1994) Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 883-887.
- Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1156-1160.
- Kinch, L.N. and Grishin, N.V. (2002) Evolution of protein structures and functions. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 400-408.
- Kirsch, R.D. and Joly, E. (1998) An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1848-1850.
- Kobayashi, I. (1998) Selfishness and death: raison d'etre of restriction, recombination and mitochondria. *Trends Genet*, **14**, 368-374.
- Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3742-3756.
- Kobe, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, **6**, 388-397.
- Kovall, R.A. and Matthews, B.W. (1999) Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 578-583.
- Kusano, K., Naito, T., Handa, N. and Kobayashi, I. (1995) Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11095-11099.
- Lacroix, L., Lacoste, J., Reddoch, J.F., Mergny, J.L., Levy, D.D., Seidman, M.M., Matteucci, M.D. and Glazer, P.M. (1999) Triplex formation by oligonucleotides containing 5-(1-propynyl)-2'-deoxyuridine: decreased magnesium dependence and improved intracellular gene targeting. *Biochemistry*, **38**, 1893-1901.
- Lanio, T., Jeltsch, A. and Pingoud, A. (2000) On the possibilities and limitations of rational protein design to expand the specificity of restriction enzymes: a case study employing EcoRV as the target. *Protein Eng*, **13**, 275-281.

- Lanio, T., Selent, U., Wenz, C., Wende, W., Schulz, A., Adiraj, M., Katti, S.B. and Pingoud, A. (1996) EcoRV-T94V: a mutant restriction endonuclease with an altered substrate specificity towards modified oligodeoxynucleotides. *Protein Eng*, **9**, 1005-1010.
- Lauer, P., Chow, M.Y., Loessner, M.J., Portnoy, D.A. and Calendar, R. (2002) Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *J Bacteriol*, **184**, 4177-4186.
- Lee, J.S., Woodsworth, M.L., Latimer, L.J. and Morgan, A.R. (1984) Poly(pyrimidine) . poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH. *Nucleic Acids Res*, **12**, 6603-6614.
- Legends
- Li, J.S., Shikiya, R., Marky, L.A. and Gold, B. (2004) Triple helix forming TRIPside molecules that target mixed purine/pyrimidine DNA sequences. *Biochemistry*, **43**, 1440-1448.
- Liu, C.M., Liu, D.P. and Liang, C.C. (2002) Oligonucleotide-mediated gene repair at DNA level: the potential applications for gene therapy. *J Mol Med*, **80**, 620-628.
- Lukacs, C.M., Kucera, R., Schildkraut, I. and Aggarwal, A.K. (2000) Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of BglII and its DNA substrate at 1.5 Å resolution. *Nat Struct Biol*, **7**, 134-140.
- Mahbubani, H.M., Chong, J.P., Chevalier, S., Thommes, P. and Blow, J.J. (1997) Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol*, **136**, 125-135.
- Maher, L.J., 3rd. (1992) Inhibition of T7 RNA polymerase initiation by triple-helical DNA complexes: a model for artificial gene repression. *Biochemistry*, **31**, 7587-7594.
- Majumdar, A., Puri, N., Cuenoud, B., Natt, F., Martin, P., Khorlin, A., Dyatkina, N., George, A.J., Miller, P.S. and Seidman, M.M. (2003) Cell cycle modulation of gene targeting by a triple helix-forming oligonucleotide. *J Biol Chem*, **278**, 11072-11077.
- Miller, P.S., Bi, G., Kipp, S.A., Fok, V. and DeLong, R.K. (1996) Triplex formation by a psoralen-conjugated oligodeoxyribonucleotide containing the base analog 8-oxo-adenine. *Nucleic Acids Res*, **24**, 730-736.
- Mills, M., Arimondo, P.B., Lacroix, L., Garestier, T., Klump, H. and Mergny, J.L. (2002) Chemical modification of the third strand: differential effects on purine and pyrimidine triple helix formation. *Biochemistry*, **41**, 357-366.
- Mukhopadhyay, P. and Roy, K.B. (1998) Protein engineering of BamHI restriction endonuclease: replacement of Cys54 by Ala enhances catalytic activity. *Protein Eng*, **11**, 931-935.
- Naito, T., Kusano, K. and Kobayashi, I. (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science*, **267**, 897-899.
- Nastri, H.G., Evans, P.D., Walker, I.H. and Riggs, P.D. (1997) Catalytic and DNA binding properties of PvuII restriction endonuclease mutants. *J Biol Chem*, **272**, 25761-25767.

- Nastri, H.G., Evans, P.D., Walker, I.H. and Riggs, P.D. (1997) Catalytic and DNA binding properties of PvuII restriction endonuclease mutants. *J Biol Chem*, **272**, 25761-25767.
- Nehrbass, U. and Hurt, E.C. (1992) Nuclear transport and nuclear pores in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **62**, 3-14.
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L.F., Schildkraut, I. and Aggarwal, A.K. (1994) Structure of restriction endonuclease BamHI and its relationship to EcoRI. *Nature*, **368**, 660-664.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. and Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**, 1497-1500.
- Pei, D., Corey, D.R. and Schultz, P.G. (1990) Site-specific cleavage of duplex DNA by a semisynthetic nuclease via triple-helix formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9858-9862.
- Pellestor, F. and Paulasova, P. (2004) The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis (Review). *Int J Mol Med*, **13**, 521-525.
- Percipalle, P., Clarkson, W.D., Kent, H.M., Rhodes, D. and Stewart, M. (1997) Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import. *J Mol Biol*, **266**, 722-732.
- Pesco, J., Salmon, J.M., Vigo, J. and Viallet, P. (2001) Mag-indo1 affinity for Ca(2+), compartmentalization and binding to proteins: the challenge of measuring Mg(2+) concentrations in living cells. *Anal Biochem*, **290**, 221-231.
- Phipps, A.K., Tarkoy, M., Schultze, P. and Feigon, J. (1998) Solution structure of an intramolecular DNA triplex containing 5-(1-propynyl)-2'-deoxyuridine residues in the third strand. *Biochemistry*, **37**, 5820-5830.
- Pingoud, A. and Jeltsch, A. (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem*, **246**, 1-22.
- Pingoud, A. and Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3705-3727.
- Radu, A., Moore, M.S. and Blobel, G. (1995) The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*, **81**, 215-222.
- Rice, M.C., Czymmek, K. and Kmiec, E.B. (2001) The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol*, **19**, 321-326.
- Rimseliene, R. and Janulaitis, A. (2001) Mutational analysis of two putative catalytic motifs of the type IV restriction endonuclease Eco57I. *J Biol Chem*, **276**, 10492-10497.

- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J. and Macelis, D. (2003) REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, **31**, 418-420.
- Sarkar, P.S. and Brahmachari, S.K. (1992) Intramolecular triplex potential sequence within a gene down regulates its expression in vivo. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5713-5718.
- Schottler, S., Wenz, C., Lanio, T., Jeltsch, A. and Pingoud, A. (1998) Protein engineering of the restriction endonuclease EcoRV--structure-guided design of enzyme variants that recognize the base pairs flanking the recognition site. *Eur J Biochem*, **258**, 184-191.
- Schulze, C., Jeltsch, A., Franke, I., Urbanke, C. and Pingoud, A. (1998) Crosslinking the EcoRV restriction endonuclease across the DNA-binding site reveals transient intermediates and conformational changes of the enzyme during DNA binding and catalytic turnover. *Embo J*, **17**, 6757-6766.
- Seidman, M.M. and Glazer, P.M. (2003) The potential for gene repair via triple helix formation. *J Clin Invest*, **112**, 487-494.
- Sen, A. and Graslund, A. (2000) Structural constraints regulating triple helix formation by A-tracts. *Biophys Chem*, **88**, 69-80.
- Simoncsits, A., Tjornhammar, M.L., Rasko, T., Kiss, A. and Pongor, S. (2001) Covalent joining of the subunits of a homodimeric type II restriction endonuclease: single-chain PvuII endonuclease. *J Mol Biol*, **309**, 89-97.
- Singleton, S.F. and Dervan, P.B. (1992) Influence of pH on the equilibrium association constants for oligodeoxyribonucleotide-directed triple helix formation at single DNA sites. *Biochemistry*, **31**, 10995-11003.
- Singleton, S.F. and Dervan, P.B. (1993) Equilibrium association constants for oligonucleotide-directed triple helix formation at single DNA sites: linkage to cation valence and concentration. *Biochemistry*, **32**, 13171-13179.
- Spyridaki, A., Matzen, C., Lanio, T., Jeltsch, A., Simoncsits, A., Athanasiadis, A., Scheuring-Vanamee, E., Kokkinidis, M. and Pingoud, A. (2003) Structural and biochemical characterization of a new Mg(2+) binding site near Tyr94 in the restriction endonuclease PvuII. *J Mol Biol*, **331**, 395-406.
- Stahl, F., Wende, W., Jeltsch, A. and Pingoud, A. (1998a) The mechanism of DNA cleavage by the type II restriction enzyme EcoRV: Asp36 is not directly involved in DNA cleavage but serves to couple indirect readout to catalysis. *Biol Chem*, **379**, 467-473.
- Stahl, F., Wende, W., Wenz, C., Jeltsch, A. and Pingoud, A. (1998b) Intra- vs intersubunit communication in the homodimeric restriction enzyme EcoRV: Thr 37 and Lys 38 involved in indirect readout are only important for the catalytic activity of their own subunit. *Biochemistry*, **37**, 5682-5688.

Stutz, A.M., Hoeck, J., Natt, F., Cuenoud, B. and Woisetschlager, M. (2001) Inhibition of interleukin-4- and CD40-induced IgE germline gene promoter activity by 2'-aminoethoxy-modified triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem*, **276**, 11759-11765.

Sugimoto, N., Wu, P., Hara, H. and Kawamoto, Y. (2001) pH and cation effects on the properties of parallel pyrimidine motif DNA triplexes. *Biochemistry*, **40**, 9396-9405.

Tang, D., Ando, S., Takasaki, Y. and Tadano, J. (2000) Mutational analyses of restriction endonuclease-HindIII mutant E86K with higher activity and altered specificity. *Protein Eng*, **13**, 283-289.

Terry, B.J., Jack, W.E. and Modrich, P. (1985) Facilitated diffusion during catalysis by EcoRI endonuclease. Nonspecific interactions in EcoRI catalysis. *J Biol Chem*, **260**, 13130-13137.

Timmons, T.M. and Dunbar, B.S. (1990) Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol*, **182**, 679-688.

Todd, A.E., Orengo, C.A. and Thornton, J.M. (2001) Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol*, **307**, 1113-1143.

Venclovas, C., Timinskas, A. and Siksnys, V. (1994) Five-stranded beta-sheet sandwiched with two alpha-helices: a structural link between restriction endonucleases EcoRI and EcoRV. *Proteins*, **20**, 279-282.

Vipond, I.B., Baldwin, G.S. and Halford, S.E. (1995) Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI restriction endonucleases. *Biochemistry*, **34**, 697-704.

Wang, G. and Xu, X.S. (2004) Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. *Cell Res*, **14**, 111-116.

Wang, G., Seidman, M.M. and Glazer, P.M. (1996) Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science*, **271**, 802-805.

Wang, Z. and Rana, T.M. (1997) DNA damage-dependent transcriptional arrest and termination of RNA polymerase II elongation complexes in DNA template containing HIV-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6688-6693.

Wende, W., Stahl, F. and Pingoud, A. (1996) The production and characterization of artificial heterodimers of the restriction endonuclease EcoRV. *Biol Chem*, **377**, 625-632.

Wu, P., Hara, H., Kawamoto, Y. and Sugimoto, N. (2001) Effect of cytosine protonation and cation on thermodynamic properties of parallel DNA triplex family. *Nucleic Acids Res Suppl*, 39-40.

Wu, P., Kawamoto, Y., Hara, H. and Sugimoto, N. (2002) Effect of divalent cations and cytosine protonation on thermodynamic properties of intermolecular DNA double and triple helices. *J Inorg Biochem*, **91**, 277-285.

Xiang, G., Bogacki, R. and McLaughlin, L.W. (1996) Use of a pyrimidine nucleoside that functions as a bidentate hydrogen bond donor for the recognition of isolated or contiguous G-C base pairs by oligonucleotide-directed triplex formation. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1963-1970.

Xodo, L.E., Alunni-Fabbroni, M. and Manzini, G. (1994) Effect of 5-methylcytosine on the structure and stability of DNA. Formation of triple-stranded concatemers by overlapping oligonucleotides. *J Biomol Struct Dyn*, **11**, 703-720.

Xodo, L.E., Manzini, G., Quadrifoglio, F., van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1991) Effect of 5-methylcytosine on the stability of triple-stranded DNA--a thermodynamic study. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5625-5631.

Xodo, L.E., Manzini, G., Quadrifoglio, F., van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1991) Effect of 5-methylcytosine on the stability of triple-stranded DNA-a thermodynamic study. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5625-5631.

Xue, L., Charles, I. and Arya, D.P. (2002) Pyrene-neomycin conjugate: dual recognition of a DNA triple helix. *Chem Commun (Camb)*, 70-71.

Young, S.L., Krawczyk, S.H., Matteucci, M.D. and Toole, J.J. (1991) Triple helix formation inhibits transcription elongation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10023-10026.